UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON VERBRENNUNGSTOXINEN AUF DEN STOFFWECHSEL ISOLIERTER HEPATOCYTEN UND MITOCHONDRIEN DER RATTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gernot Bruchelt
aus Deutschlandsberg

1980

1981

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON VERBRENNUNGSTOXINEN AUF DEN STOFFWECHSEL ISOLIERTER HEPATOCYTEN UND MITOCHONDRIEN DER RATTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gernot Bruchelt
aus Deutschlandsberg

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	22.12.1980
Dekan	Prof. Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter	Prof. Dr. W. Voelter
2. Berichterstatter	Prof. Dr. J. Guglielmi

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterbrechungen in der Zeit von März 1977 bis Februar 1980 am Lehrstuhl für Organische Chemie I, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Direktor Prof.Dr.E.Bayer und im Labor der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen, Direktor Prof.Dr.L.Koslowski unter wissenschaftlicher Anleitung von Herrn Prof.Dr.W.Voelter angefertigt.

Herrn Prof.Dr.W.Voelter danke ich sehr herzlich für die ständige Betreuung meiner Arbeit, Herrn PD Dr.Dr.Schmidt bin ich zu großem Dank für wertvolle Hinweise und Anregungen während der Durchführung meiner Arbeit verpflichtet.

Herrn Prof.Dr.E.Bayer und Herrn Prof.Dr.L.Koslowski danke ich für die Überlassung von Arbeitsplätzen in ihren Instituten.

Herrn U.Beckert und Herrn E.Steinbrenner danke ich für die Anfertigung verschiedener Geräte im Verlaufe dieser Arbeit

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Elke Roth für ihre Mitarbeit an der Hepatocytenisolierung und für die schöne Zusammenarbeit bedanken.

Verzeichnis der Abkürzungen:

LDH	: Lactat-Dehydrogenase EC 1.1.1.27
GOT	: Aspartat-Aminotransferase EC 2.6.1.1
GPT	: Alanin-Aminotransferase EC 2.6.1.2
GlDH	: Glutamat-Dehydrogenase EC 1.4.1.3
RNA	: Ribonucleinsäure
SDS	: Natriumdodecylsulfat
TCA	: Trichloressigsäure
EGTA	: Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure
CCP	: Carbonyl-Cyanid-m-Chlorphenylhydrazon
ATP	: Adenosintriphosphat
ADP	: Adenosindiphosphat
AMP	: Adenosinmonophosphat
LPS	: Lipopolysaccharid
PPO	: 2,5 Diphenyloxazol
POPOP	: 2,2'-p-Phenylen-bis-(5-Phenyloxazol)
RES	: Retikuloendotheliales System
ACR	: Acceptor-Control-Ratio
cpm	: Impulse pro Minute
rpm	: Umdrehungen pro Minute

VT	: Basler Verbrennungstoxin
Nativ	: Monomere Vorstufe des Basler Verbrennungstoxins
Carbogen	: 95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Charakterisierung des Basler Verbrennungstoxins	3
1.2.	Wahl der Testsysteme	8
1.3.	Anmerkungen zur Hepatocytenisolierung	9
2.	Ergebnisse	14
2.1.	Letalitätstest	14
2.2.	Charakterisierung der Dialysate	14
2.3.	Charakteristika der isolierten Zellen	15
2.4.	Licht- und elektronenmikroskopische Charakterisierung der isolierten Hepatocyten	16
2.5.	Lichtmikroskopische Untersuchungen an Hepatocyten nach Inkubation mit verschiedenen Zusätzen	16
2.6.	Trypanblautest nach Inkubation mit verschiedenen Zusätzen	19
2.7.	Enzymabgabe ins Medium nach Inkubation mit verschiedenen Zusätzen	20
2.8.	Proteinbiosynthese	21
2.9.	RNA-Synthese	24
2.10.	Gluconeogenese	29
2.11.	Harnstoffsynthese	30
2.12.	Bestimmung von ATP/ADP/AMP und des ATP/ADP-Quotienten	31
2.13.	Messung verschiedener Atmungsparameter an Hepatocyten	32
2.13.1.	Messung der Basisatmung	32
2.13.2.	Beeinflussung der Hepatocytenatmung durch Succinat	33
2.14.	Einfluß von Glucagon auf die Gluconeogenese	35
2.15.	Atmungsmessungen an Mitochondrien	35
2.15.1.	Messung an vorbehandelten Tieren	35
2.15.2.	Direktinkubation	38
3.	Diskussion	42
4.	Materialien	61

5.	Methoden	61
5.1.	Isolierung des Verbrennungstoxins und seiner nativen Vorstufe	61
5.2.	Isolierung der niedermolekularen Dialysate aus verbrannter und unverbrannter Haut	63
5.3.	Gewinnung des (trockenen) Destillats	63
5.4.	Isolierung der Hepatocyten	64
5.5.	Trypanblautest	65
5.6.	Vorbereitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie	65
5.7.	Bestimmung der Aktivität von LDH, GOT, GPT, GlDH	66
5.8.	Messung von ATP, ADP, AMP	66
5.9.	Messung der Gluconeogenese	67
5.10.	Messung der Harnstoffsynthese	67
5.11.	Messung der RNA-Synthese	67
5.12.	Messung der Proteinsynthese	67
5.13.	Proteinbestimmung	68
5.14.	Isolierung der Mitochondrien	68
5.15.	Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien	69
5.16.	Übersicht der durchgeführten Versuche	71
6.	Zusammenfassung	72
7.	Literaturverzeichnis	74

1. EINLEITUNG

Schwerverbrannte haben auch heute - trotz intensiver Anstrengungen auf dem Gebiet der Forschung und Therapie - kaum Chancen, eine Verbrennung dritten Grades von mehr als 50% Körperoberfläche zu überleben. Während es im Laufe der Zeit zwar immer besser gelungen ist, die akute Schockphase nach Verbrennungen unter Kontrolle zu bringen, ist eine Verminderung der Mortalität in der sich daran anschließenden latenten Schockphase (nach 2-4 Wochen) nicht zu verzeichnen (1,2).

Unmittelbar nach der Verbrennung kommt es zu einer sympathikotonen Reaktionslage, die Katecholaminausschüttung ist stark erhöht, es kommt zur Ausbildung von Mikrothromben, zu verminderter Sauerstoffversorgung der Gewebe und - dadurch bedingt - zu metabolischer Acidose. Durch die Hitzeeinwirkung kommt es ferner zu Permeabilitätsstörungen, die zu Elektrolytverschiebungen, zum Verlust der Plasmaproteine und zur Erhöhung der Blutviskosität führen. Störungen im Gerinnungssystem sind ebenfalls zu verzeichnen. Besonders verhängnisvoll wirkt sich auch die unter Schockbedingungen verminderte Aktivität des RES aus (3). Während sich die Situation des Verbrannten in dieser Phase durch geeignete Therapiemaßnahmen zwar beherrschen läßt, so ist doch bereits hier der Grundstein für die weiteren Komplikationen im Verlauf der Verbrennungskrankheit gelegt.

Nach dieser sogenannten Frühphase (Schock- und Ödemphase) kommt es im weiteren Verlauf der Krankheit häufig zu Nieren- und Herzinsuffizienz, Lungen- und Hirnödem, zu Anämie und Darmparalyse, letztere hat u.a. eine verstärkte Resorption von Endotoxin zur Folge. Besonders gefürchtet sind Infektionen, da gerade die verbrannte Haut ideale Bedingungen für eine bakterielle Besiedlung bietet. Eine Sepsis, verursacht vor allem durch gram⁻Bakterien (bes. durch Pseudomonas

seruginosa) ist häufig zu beobachten (1,4).
Immer wieder wurde die Vermutung geäußert, daß noch weitere Faktoren für den häufig letalen Ausgang der Verbrennungskrankheit verantwortlich sind: Durch die Einwirkung thermischer Energie auf die Haut soll es zur Bildung toxisch wirksamer Substanzen kommen: Einerseits dadurch, daß aus den nicht direkt von der Hitzeeinwirkung betroffenen Schichten Substanzen mit biologischer Wirkung freigesetzt werden (etwa Histamin oder lysosomale Enzyme) oder aber, daß durch direkte Einwirkung thermischer Energie neue, toxisch wirksame Substanzen aus Bestandteilen der Haut oder des Blutes gebildet werden. Untersuchungen in unserem Labor führten z.B. zum Nachweis, daß durch die Verbrennung niedermolekulare Substanzen von zum Teil ausgeprägter Toxizität entstehen (5,6). Andere Arbeitsgruppen beschäftigten sich ebenfalls mit dieser Fragestellung. Nach den Referenzen 7 und 8 sollen z.B. Serumproteine beim Erhitzen über 80°C toxische Eigenschaften annehmen. Rosenthal (9-13) beschreibt die Isolierung eines Glykoproteins aus verbrühter Haut, das am perfundierten Rattenherz ein verändertes EKG-Muster zeigt. An isolierten Muskelfibrillen inhibiert dieses Verbrennungstoxin die ATP-abhängige Kontraktion. Inhibition der Sauerstoffaufnahme bei Mitochondrien sowie elektronenmikroskopisch sichtbare Veränderungen derselben werden beschrieben. Auch von einem Antitoxin wird berichtet und davon, daß ähnliche Glykoproteine im Serum Verbrannter gefunden wurden. Baxter (14) charaskterisierte einen sog."myocardial depressant factor," eine nach Verbrennungen im Blut zirkulierende, niedermolekulare Verbindung, die am isolierten Herzen und nach ihrer Injektion, auch bei unverbrannten Tieren wirksam ist.
Federow und Mowschew (15,16) isolierten aus verbrannter Haut hochmolekulare Verbindungen, die am Versuchstier ebenfalls toxisch wirken .
Seit Beginn des vorigen Jahrzehnts sind vor allem die

Arbeiten der Basler Gruppe um Allgöwer und Schönenberger zu erwähnen: Sie beschreiben die Isolierung und Charakterisierung eines Verbrennungstoxins, das über die Fachliteratur (17-41) hinaus auch in der populärwissenschaftlichen Literatur (42) interessierte Beachtung fand. Sogar ein eigener Kongress (43) war nur diesem Toxin gewidmet.
Einige Arbeiten im Zusammenhang mit dem Basler VT wurden auch an unserer Klinik durchgeführt (44-47). Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß dieses Toxins, hier kurz Verbrennungstoxin (VT) genannt, auf den Leberstoffwechsel zu untersuchen. Zu Beginn soll deshalb eine eingehende Beschreibung des Basler Verbrennungstoxins an Hand der Literatur gegeben werden, um die Auswahl der eigenen Untersuchungen zu begründen.

1.1. Charakterisierung des Basler Verbrennungstoxins

Isolierung

Rasierte Mäusehautstücke werden 15 Sekunden bei 250°C verbrannt. Nach Homogenisierung, einer Ammoniumsulfat- und einer Acetonfällung wird in 5%iger Ausbeute ein Zwischenprodukt erhalten, das sich in einer abschließenden Sucrosedichtegradientenzentrifugation in zwei Banden (Dichte: 1,14 bzw. 1,18) spalten läßt. Die identische Aufarbeitung eines unverbrannten Hauthomogenats führt lediglich zur Ausbildung einer Bande bei einer Dichte von 1,14. Nur die Bande mit der Dichte 1,18 erwies sich im Tierversuch als toxisch. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß die nur in verbrannter Haut vorkommende Bande ein Umwandlungsprodukt einer nativen Vorstufe, eben der Bande mit der Dichte 1,14, darstellt. Menschliche Haut wurde in der gleichen Weise aufgearbeitet: Wieder zeigten sich nach Verbrennung zwei Banden (Dichte: 1,25/ 1,31), während unverbrannte Haut nur eine Bande (Dichte: 1,25) lieferte. Die verschiedenen Dichten im Vergleich zu Mäusehaut werden auf unterschiedliche Lipidanteile zurückgeführt. Im Serum

Verbrannter wurde nach ähnlichen Substanzen gesucht: Blut von Verbrannten, deren Tod zwischen dem 5. und 15. Tag eintrat, wurde nach der Gerinnung zentrifugiert; aus dem Überstand wurde bei pH 4,5 ein Zwischenprodukt gewonnen, das sich im Sucrosegradienten in zwei Banden (Dichte: 1,14/ 1,18) spalten ließ (Ausbeute:ca 30mg/l). Im Serum gesunder Probanden trat unter diesen Bedingungen keine Bande auf. Die Bande der Dichte 1,18 erwies sich als toxisch, die Bande mit der Dichte 1,14 war völlig inaktiv.

Analytik des Verbrennungstoxins und seiner Vorstufe

Delipidierung nach Folch (48) führte in beiden Fällen zu einem Apoproteinanteil (60%) und einem Lipidanteil (40%), bestehend aus Mono-, Di- und Triglyceriden, Cholesterin, Cholesterinester und freien Fettsäuren. Das Apoprotein ließ sich disk-elektrophoretisch in 6 Untereinheiten mit einem MG zwischen 4o ooo und 16o ooo auftrennen. Aus dem Apoproteinanteil ließen sich durch Totalhydrolyse noch 13% Lipide extrahieren (innere Lipide). Bei der Analyse der Aminosäurenzusammensetzung des Apoproteins wurde kein Hydroxyprolin gefunden. 1% Aminozucker wurden festgestellt, der Phosphatgehalt betrug 0,2%.

Diese Daten wurden praktisch in gleicher Weise sowohl von der Bande mit der höheren Dichte als auch von der Bande mit der geringeren Dichte erhalten. Auch zwischen Mäuse- und Menschenhaut zeigten sich nur geringfügige Unterschiede.

Ausgehend von diesen Analysendaten wurde eine Modellvorstellung entwickelt: Die native Vorstufe, deren Sitz in der Plasmamembran der Basalzellen der Epidermis vermutet wird (MG: $1x10^6$), besitzt als zentralen Kern das Apoproteinmolekül, um dieses herum lagert sich eine dichte Lipidhülle. Durch Einwirkung thermischer Energie soll es zu einer Trimerisierung dieser nativen Vorstufe unter Bildung des Verbrennungstoxins (MG: $3x10^6$) kommen; in gleicher Weise wie bei der

nativen Vorstufe ist auch hier der nun verdreifachte Apoproteinkern von einer Lipidhülle umgeben. Elektronenmikroskopische Aufnahmen werden als Bestätigung dieser Modellvorstellung herangezogen. ESR-Studien wurden durchgeführt, um die Frage nach der Lokalisierung antigen wirksamer Bereiche zu klären; mit Hilfe von spin-label-Experimenten konnte angeblich gezeigt werden, daß der Apoproteinanteil an einigen wenigen Stellen durch die dichte Lipidhülle hindurch Kontakt mit dem wässrigen Medium hat.

Der Toxizitätstest und allgemeine Eigenschaften des VT

VT aus Mäusehaut wurde Mäusen nach Blockierung des RES mit Thorotrast i.p. injiziert: Injektion von 0,3 mg VT/g Maus führte innerhalb von 48 Stunden bei 100% der Tiere zum Tod, eine Dosis von 0,25 mg VT/g Maus überlebten alle Tiere! Bei nicht blockiertem RES erhöhte sich die Letaldosis auf 0,6 mg/g Maus. Die native Vorstufe wirkte auch in 10-fach höherer Dosis nicht letal. Die entsprechende Letaldosis bei VT aus Menschenhaut wird mit 1,3 mg/g Maus angegeben. Als Erklärung wird der im Vergleich zum VT aus Mäusehaut geringere Lipidanteil herangezogen. Das führt weiter zu der Frage, welche Komponenten des VT für dessen Toxizität verantwortlich sind: Bei Injektion des Apoproteins (5% Lipidanteil) allein reduziert sich die Mortalität von 100 auf 40%. Ein Gemisch der im Apoprotein vorhandenen 6 Peptidketten, die durch Mercaptoäthanolbehandlung isolierbar sind, zeigt keinerlei Toxizität, ebenso ist auch der nach Folch isolierbare äußere Lipidmantel unwiksam.
Eine Rekombination des Apoproteins mit der äußeren Lipidhülle ist durch einfaches Zusammenfügen der beiden VT-Anteile und zweistündiges Rühren bei 60°C möglich; dabei steigt die Toxizität wieder auf 100% an. Unabdingbare Voraussetzung für die Formation des VT ist eine Verbrennung bei Hauttemperaturen knapp über 100°C. Aus diesem Grunde tritt das VT niemals bei

Verbrühungen (Ambustiones) auf. Das VT wird sehr langsam aus der verbrannten Haut resorbiert (7-10 Tage); ist es aber einmal in den Blutstrom gelangt, so wird es sehr schnell von den entsprechenden Rezeptorzellen aufgenommen.

Immunologische Gesichtspunkte

Nachdem das VT und seine native Vorstufe charakterisiert waren, wurden Konzepte entwickelt, um Antitoxine dagegen zu erhalten. Schönenberger berichtet von der Isolierung eines reinen Antitoxins durch Affinitätschromatographie an delipitiertem Apoproteinanteil des VT. Aus Verbrennungsstatistiken ist bekannt, daß in über 70% der Fälle einer Verbrennung mit tödlichem Ausgang eine Sepsis, verursacht meist durch Pseudomonas aeruginosa, gefunden wird (49). Aus diesem Befund leitet sich folgender Versuch ab: Nach einer experimentell gesetzten subletalen Pseudomonasinfektion oder einer subletalen Verbrennung überlebten 80% der Tiere. Verabreichte man nun, gemeinsam mit der Infektion, eine subletale Dosis an VT, so sinkt die Überlebensrate auf 20%. Bei Behandlung mit Antitoxin stieg die Überlebensrate wieder auf die ursprünglichen 80% an. Aufgrund dieser Versuche wurde die Vermutung ausgesprochen, daß die Ursache für die Sepsis in einer - durch das VT verursachten - spezifischen Schädigung der Wirtszelle zu suchen ist, die sie weniger widerstandsfähig gegen Infektionen macht.
Inzwischen ist es auch gelungen, das VT im Serum Verbrannter mit Hilfe der"complement fixation reaction" (CBR) nachzuweisen: Bei einem Doppelblindversuch an 24 Verbrannten zeigte sich folgendes Bild: Von 11, später am Verbrennungstrauma gestorbenen Patienten, zeigten 10 eine positive CBR, während in nur 3 Fällen von 13 Überlebenden VT nachgewiesen werden konnte.

Untersuchungen nach Applikation von Verbrennungstoxin

Im Lichtmikroskop sind nach Verabreichung des VT keine

Veränderungen an Gehirn, Herz, Lunge, Leber und Milz festzustellen. Gelegentlich wurde eine proximale tubuläre Nekrose beobachtet. Interessant ist der Befund, daß 24 Stunden nach Injektion einer letalen Dosis an VT eine gegenüber Kontrollgruppen 3-4 fach erhöhte Ausscheidung von Kreatinin und Harnstoff beobachtet wurde.

Zur Aufklärung, in welchen Organen das VT und seine native Vorstufe nach ihrer Injektion zu finden sind, wurde eine Ganzkörperradiographie durchgeführt: Im Falle des VT sah man eine Verteilung über fast alle Organe, besonders groß war die Anreicherung in der Leber. Die native Vorstufe wurde im Gegensatz dazu von den Parenchymzellen schlechter aufgenommen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Leber verbrannter Mäuse bzw. mit VT vorbehandelter Tiere zeigten gegenüber Kontrollgruppen deutliche Veränderungen in der Struktur der Mitochondrien: Vacuolisation und Cristolyse waren zu beobachten. Wurden die Tiere allerdings mit Antitoxin behandelt, so zeigten sich keine Mitochondrienschädigungen.

Isolierte Hepatocyten von mit VT vorbehandelten Ratten zeigten starke Protrusionen, die allerdings noch stärker ausgeprägt waren, wenn Hepatocyten unbehandelter Ratten direkt mit VT inkubiert wurden.

Stoffwechseluntersuchungen nach Applikation des VT wurden an der perfundierten Leber und an isolierten Hepatocyten vorgenommen. Bei Verwendung der perfundierten Leber als Testsystem wurden eine Reihe von Stoffwechselveränderungen im Vergleich zu Kontrollgruppen beobachtet, wenn die Untersuchungen 5 Tage nach Vorbehandlung der Ratten mit VT durchgeführt wurden: Reduziert waren dabei der ATP/ADP-Quotient, die Gluconeogenese und die Harnstoffsynthese. Isolierte Hepatocyten von mit VT vorbehandelten Tieren zeigten ebenfalls eine reduzierte Gluconeogenese und Harnstoffsynthese, ebenso eine verringerte Glykogensynthese. Im Gegensatz dazu war die Gluconeogenese und die

Harnstoffsynthese bei direkt mit VT inkubierten Hepatocyten gegenüber Kontrollgruppen kaum verändert, während die Glykogensynthese reduziert war. Die Abgabe von Aminosäuren ins Medium ist nach Behandlung mit VT deutlich erhöht.

1.2. Wahl der Testsysteme

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß dieses Basler Verbrennungstoxins auf verschiedene Stoffwechselleistungen der Leber zu untersuchen. Aufgrund der bereits existierenden Befunde interessierten in erster Linie Fragen, die auf eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels schließen ließen. Dadurch war die Auswahl der in Betracht kommenden Versuche festgelegt:
Zum einen wurden isolierte Mitochondrien als Testsystem gewählt, um die Verhältnisse bei der Atmungskettenphosphorylierung zu untersuchen.
Zum anderen wurden Versuche an isolierten Leberzellen durchgeführt. Grundsätzlich stand zur Wahl, isolierte Hepatocyten oder die perfundierte Leber zu verwenden. Die perfundierte Leber bietet zweifellos den sehr großen Vorteil, daß die Leber als Ganzes Verwendung finden kann, wodurch auch Versuche mit vorbehandelten Tieren gut durchführbar sind: Eventuell geschädigte Zellen verbleiben im Zellverband, geben sich aber im Verlaufe der Perfusion als solche zu erkennen, z.B. durch vermehrte Enzymabgabe ins Medium. Im Gegensatz dazu kann die Verwendung isolierter Hepatocyten von vorbehandelten Tieren recht problematisch sein: Die Isolierung stellt für jede Zelle einen ziemlich strapaziösen Vorgang dar, da sie erst - mit enzymatischen und mechanischen Mitteln - aus ihrem Verband herausgelöst werden muß; es ist zu erwarten, daß gerade vorgeschädigte Zellen die Aufarbeitung am schlechtesten überstehen, sodaß die Gefahr besteht, daß man seine Untersuchungen eventuell an einem Kollektiv intakter Zellen durchführt. Aus diesem Grunde wurde die Direktinkubation des VT mit isolierten

Hepatocyten nicht vorbehandelter Tiere als Testsystem verwendet.Da nach den Angaben Schönenbergers einmal von der Wundfläche resorbiertes VT sehr schnell mit den Parenchymzellen in Wechselwirkung tritt,handelt es sich dabei offensichtlich um ein geeignetes Untersuchungssystem.
Die Verwendung isolierter Hepatocyten hat gegenüber der Verwendung der perfundierten Leber auch eine Reihe von Vorteilen:
Hepatocyten sind in großer Menge isolierbar,sodaß eine Anzahl verschiedener Parameter gleichzeitig und unabhängig voneinander bestimmt werden kann.
Verschiedene Inkubationszusätze können gleichzeitig nebeneinander zum Einsatz kommen,wodurch die Möglichkeit zum direkten Vergleich gegeben ist.
Da das System aus einer einheitlichen Zellpopulation besteht(nur Parenchymzellen), ist die Zuordnung der erhobenen Befunde eindeutiger.
Das System ist sehr gut standardisierbar;da man immer mit direkten Kontrollen arbeitet,werden Schwankungen in der biologischen Aktivität bzw. der Güte der jeweiligen Präparation ausgeglichen.Im Gegensatz dazu ist bei der Verwendung der perfundierten Leber ein größeres Versuchskollektiv erforderlich,um zu eindeutigen Aussagen gelangen zu können.
Neben dem Verbrennungstoxin wurden im Rahmen dieser Arbeit auch niedermolekulare Extrakte verbrannter und unverbrannter Haut auf ihre mögliche Beeinflußbarkeit des Leberstoffwechsels untersucht.

1.3. Anmerkungen zur Hepatocytenisolierung

Untersuchungen mit vitalen,in großen Mengen zur Verfügung stehenden Leberzellen sind erst seit den Arbeiten von Howard (50) und vor allem von Berry und Friend (51) durchführbar.Seitdem (1969) hat diese Methode weltweit Einzug in die Laboratorien gehalten,wobei allerdings die ursprüngliche Arbeit von Berry und Friend mannigfach modifiziert wurde.Da wir in unserem Labor über keine Erfahrung bei der Hepatocyten-

isolierung verfügten, mußte die Methode an Hand der vorliegenden Literatur ausgearbeitet werden. Diese weicht aber häufig auch in zentralen Punkten voneinander ab. Es stellt sich nun das Problem, die wichtigsten Schritte (Wahl der besten Operationstechnik, der richtigen Vorperfusion und einer optimalen Enzymperfusion) für die Praxis auszuwählen.

Nach der von Berry (52) angegebenen Operationstechnik wird, nach Öffnung des Bauches der Ratte, eine lose Schlinge um die cava inferior oberhalb des rechten Nierenabganges gelegt. Dann wird die vena portae kanüliert und die cava unterhalb des Nierenabganges gleichzeitig geöffnet, was eine sofortige Entblutung der Leber zur Folge hat. Anschließend wird der Brustraum geöffnet und die cava, vom Vorhof her kommend, kanüliert. Gleichzeitig wird die cava oberhalb des rechten Nierenabganges zugebunden, wodurch der Pufferstrom von der Pfortader in Richtung Cavakanüle gelenkt wird. Die eben beschriebene Methode wurde im Verlaufe dieser Arbeit als erste erprobt; dabei traten einige Schwierigkeiten auf: Die Verbindung vena portae/Kanüle ist nicht besonders stabil, Verdrillungen - die meist eine gestörte Durchblutung der Leber zur Folge hatten - traten häufig bei der Herauspräparation der Leber aus dem Tier auf, ebenso gab es gelegentlich Komplikationen bei der anschließenden Fixierung der Leber auf der Siebplatte. Außerdem bewirkt die Collagenase bei länger andauernden Perfusionen ein Brüchigwerden der Verbindung Kanüle/Pfortader. Baur (53) umgeht dieses Problem, indem nach einiger Zeit die Perfusionsrichtung umgedreht wird (von der cava in Richtung vena portae). Diese, den physiologischen Verhältnissen entgegengesetzte Perfusionsrichtung, verwenden einige Gruppen gleich von Beginn an, offensichtlich um den eben geschilderten Nachteilen aus dem Wege zu gehen (54): Eine primäre Kanülierung der cava vom Vorhof her unter gleichzeitiger Öffnung der Pfortader führte bei unseren Untersuchungen aber sehr häufig zu schlecht ent-

blutenden Lebern. Schließlich hat sich in unserem Labor folgende Methode bewährt: Nach Kanülierung der Pfortader und gleichzeitigem Durchschneiden der cava unterhalb des Nierenabganges (=sofortige Entblutung der Leber) wird die cava vom Vorhof aus kanüliert. Unmittelbar danach wird die Richtung des Perfusionsstromes umgekehrt: Die Leber ist nun sehr bequem aus dem Tier herauszuoperieren, sie ist problemlos auf der Siebplatte zu postieren und die Verbindung Kanüle/cava hält der 15-25 minütigen Enzymperfusion gut stand.

Vorperfusion:

Unabdingbare Voraussetzung für das Gelingen der Hepatocytenisolierung ist die Verwendung eines Calcium-freien Vorperfusionsmediums. Im einzelnen müssen dabei aber einige Punkte beachtet werden: Offensichtlich ist ein Calcium-abhängiger Adhäsionsfaktor für den Zusammenhalt der Zellen (mit) verantwortlich (55,56). Die Entfernung des Calciums führt damit zu einer Auflockerung des Zellverbandes. Diese Entfernung wird einerseits durch Verwendung von Komplexbildnern wie Citrat und EGTA (57-59), andererseits durch einfaches Auswaschen mit Calcium-freiem Medium bewirkt. Da die Calciumkonzentration, die für den Zusammenhalt der Zellen benötigt wird, recht gering ist, ist es - besonders bei Verzicht auf Komplexbildner - günstig, die Vorperfusion relativ lange nicht rezirkulierend durchzuführen (10-12 Minuten, bei 3-4 ml/min/g Leber).

Enzymperfusion:

Ursprüngliche Versuche zur Isolierung von Leberzellen bedienten sich weitestgehend mechanischer Methoden, wobei den Perfusionsmedien von manchen Autoren Chelatbildner zugegeben wurden, von anderen nicht (60). Die auf diese Weise isolierten Zellen konnten aber die geforderten Vitalitätskriterien nicht erfüllen. Allmählich fanden enzymatische Methoden Verwendung: So wurde die Zelldissoziation mittels Trypsin versucht (61-63), das aber offensichtlich nicht sehr wirksam ist und selbst schädigend auf die Parenchymzellen wirkt; aus

diesem Grunde führen manche Autoren ihre Zellisolierungen in Gegenwart von Trypsininhibitoren durch, um ev. vorhandene Verunreinigungen der verwendeten Collagenasen auszuschalten (54). Lysozym ist nach Seglen unwirksam (63), auch Pronase hat nicht den gewünschten Effekt, im Gegenteil, es zerstört selektiv Parenchymzellen, während es den Anteil an Nichtparenchymzellen der Leber unbeschädigt läßt (64,65). Es wird deshalb zur Isolierung von Kuppferschen Sternzellen verwendet. Schließlich wurde von Howard die Verwendung von Collagenase und Hyaluronidase empfohlen (50), die seitdem (1967) von sehr vielen Arbeitsgruppen verwendet werden. Allerdings fällt bei Durchsicht der neueren Literatur auf, daß immer mehr Gruppen auf die Verwendung von Hyaluronidase verzichten. Hyaluronidase für sich allein ist wirkungslos, in Verbindung mit Collagenase soll sie aber nach (50,66) einen günstigen Effekt auf die Zellausbeute haben, was aber von anderen Gruppen nicht bestätigt werden konnte (67). Seglen fand sogar, daß Hyaluronidase in höheren Konzentrationen einen hemmenden Effekt ausübt (63). Somit ist schließlich nur Collagenase als wirksame Komponente übriggeblieben. Allerdings besteht auch über ihren Wirkungsmechanismus noch keineswegs Klarheit: Manche Autoren nehmen an, daß nicht Collagenase an sich, sondern deren proteolytisch wirksame Verunreinigungen für die Aktivität verantwortlich sind.(68). Andererseits wurde auch hochgereinigte Collagenase als wirksam gefunden (63). Ein weiterer strittiger Punkt in der Literatur ist die Frage, ob der Schritt der Collagenaseperfusion in Anwesenheit oder in Abwesenheit von Calcium durchgeführt werden soll. Während in den ersten Jahren nach Einführung dieser neuen Methode die meisten Gruppen auf die Verwendung von Calcium verzichteten (67,69,70, 71,54), wird in letzter Zeit eher der Collagenaseperfusion in Anwesenheit von Calcium der Vorzug gegeben. Zellen, die mit Ca^{++}/Collagenase isoliert werden, erfüllen verschiedene Vitalitätskriterien besser (53,72).

Von Collagenase ist außerdem bekannt, daß sie zur Entfaltung ihrer Aktivität Ca^{++} benötigt (73). Allerdings könnten die in den herkömmlichen Präparationen enthaltenen Ca^{++}-Konzentrationen durchaus ausreichend sein, um eine genügend hohe Enzymaktivität zu gewährleisten. Darüber hinaus stellt Ca^{++} einen wichtigen Bestendteil für die Integrität der Zellmembran dar: Baur (53) beschreibt z.B., daß Zellen, die in Gegenwart von Ca^{++} isoliert wurden, ein bedeutend höheres Membranpotential besitzen; dabei reichen offensichtlich sehr geringe Konzentrationen aus, um diesen Effekt zu erzielen (0,1 - 0,3 mM). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hepatocytenisolierungen wurden teilweise nach den Empfehlungen von Seglen in Anwesenheit von Ca^{++} durchgeführt, teilweise wurde die Vorschrift Wagles (67) verwendet, der mit der Ca^{++}-freien Methode bessere Ausbeuten erreichte.

2. ERGEBNISSE

2.1. Letalitätstest

Das Präzipitat der Acetonfällung wurde als "Verbrennungstoxin" eingesetzt, da es nicht möglich war, dieses nach der Dichtegradientenzentrifugation in das Toxin und seine native Vorstufe zu trennen. Für praktische Zwecke spielte das aber eine untergeordnete Rolle: Entsprechend den Angaben Schönenbergers sollte mit dem eingesetzten Toxin/Nativgemisch eine Dosis von ca. 1-1,2 mg/g Maus ausreichend sein, um ohne Thorotrastblockierung eine 100%ige Letalität im Versuchsansatz zu erzeugen. Mehrere Präparationen wurden vor ihrem Einsatz zu Stoffwechseluntersuchungen getestet. Dabei waren die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse nicht zu reproduzieren: Bei einer Dosis von 1 mg VT/g Maus waren fast nie Todesfälle zu beobachten, auch bei Erhöhung der Dosis auf 3-4 mg/g Maus waren sie selten. Aber auch diese Fälle unterscheiden sich nicht prinzipiell von mit der nativen Vorstufe vorbehandelten Mäusen, auch hier kam es gelegentlich zu einem positiven Ausgang des Letalitätstests.
Die Testung einer einzigen Präparation war eindeutig: In einer Versuchsreihe wurden 4 Ratten (200 g) mit je 100 mg VT behandelt: Nach 4 Tagen waren alle Tiere tot. Bei diesen Tieren waren Leberveränderungen erkennbar, wie sie auch nach Aplikation von Endotoxin (E.coli) zu beobachten waren. Obwohl die Aufarbeitung der verbrannten Haut unter möglichst sorgfältigen Bedingungen durchgeführt wurde (es wurde aber nicht unter sterilen Bedingungen gearbeitet), ist eine Kontamination - und damit ein Einschleppen von Endotoxin - nicht auszuschließen. Verwiesen sei in diesem Zusammenhang auch auf eine Arbeit, in der belegt wird, daß sogar ein großer Teil der käuflichen Albuminpräparate mit Endotoxin verunreinigt ist (84).

2.2. Charakterisierung der Dialysate

Die nach (5.2.) isolierten Dialysate verbrannter und

unverbrannter Haut wurden keiner eingehenden Analytik unterzogen. Lediglich einige Basisparameter wurden bestimmt.

	1	2	3
pH	6,51	6,75	6,31
Osm/l		0,23	0,27
Na^+	121	56	58
K^+	60	28	33
Cl^-	119	67	73

1: Dialysat I,verbr.
2: DialysatII,verbr.
3: Dialysat II,unverbr.

Elektrolytangaben in mval/l

2.3. Charakteristika der isolierten Zellen

Die Zellen wurden jeweils nach der Isolierung mikroskopisch mittels des Trypanblautests (87) untersucht. 89-96% waren durch Trypanblau nicht anfärbbar. Als weiteres Vitalitätskriterium wurde nach manchen Isolierungen die Stimulierbarkeit der Atmung nach Zugabe einer 1 mmolaren Succinatlösung herangezogen, entsprechend den Empfehlungen Baurs (53). Der Wert der Atmungsstimulierung betrug 1,09 $\pm$ 0,09 (n=10). Die Inkubationen wurden bei 37°C unter ständiger Carbogenbegasung und unter leichtem Schütteln der Ansätze durchgeführt. Unter diesen Bedingungen waren die Zellen nach 150 Minuten Inkubation noch zu ca. 80% vital (Trypanblautest). Besonders wichtig erwies sich eine gute Sauerstoffversorgung der Zellen während der Inkubation: Zellen, die ohne Carbogenbegasung inkubiert wurden, waren nach 120 Minuten bereits zu 70% mit Trypanblau anfärbbar, gaben vermehrt Enzyme ins Medium ab und zeigten stark reduzierte RNA-Syntheseraten. Als weitere charakteristische Zellgröße wurde der Atmungskontrollkoeffizient, als das Verhältnis von entkoppelter zu endogener Atmung bestimmt: Bei zwei Bestimmungen wurden dabei nach Zugabe von 1 mM CCP unmittelbar nach der Isolierung

Werte von 1,63 und 1,75 erhalten. Nach 60 Minuten Inkubation stiegen diese Werte auf 2,2 - 2,7 an (69). Zur Charakterisierung verschiedener Stoffwechselleistungen der isolierten Hepatocyten werden in der Literatur unterschiedliche Bezugsgrößen angegeben: Zellzahl, Proteingehalt, Hepatocrit, Trocken- und Feuchtgewicht, In dieser Arbeit wurde meist die Zellzahl bzw. der Proteingehalt als Bezugsgröße verwendet: 10^6 Zellen entsprachen dabei einem Proteingehalt von 1,38 $\pm$ 0,16 mg.

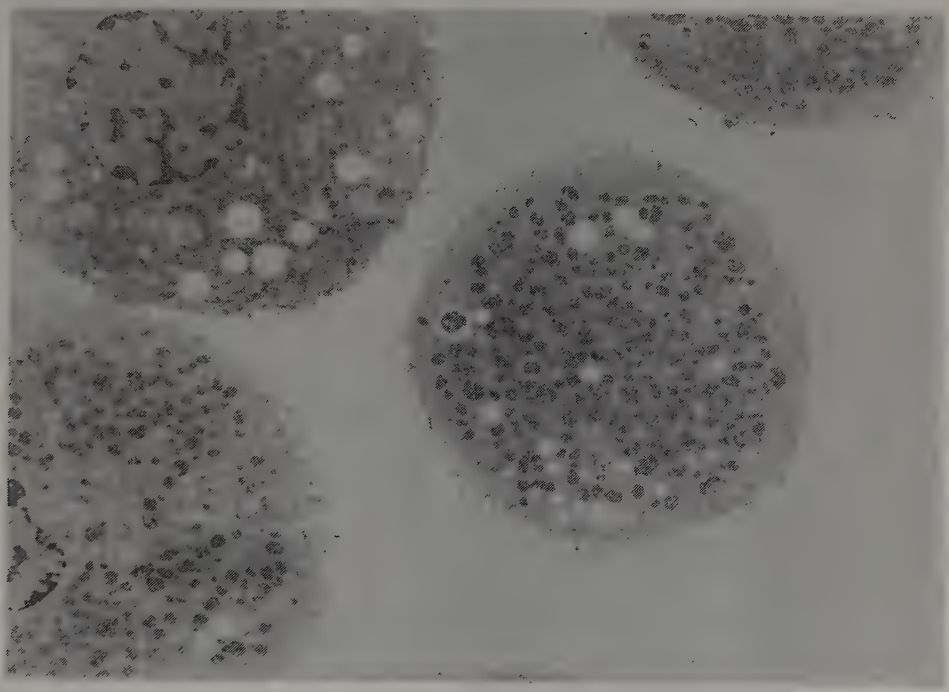
2.4. Licht- und elektronenmikroskopische Charakterisierung der isolierten Hepatocyten (51,67,89-91)

Abb.2a zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme isolierter Hepatocyten nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C. In den morphologisch gut erhaltenen Zellen kann man die Unversehrtheit der Plasmamenbran sowie zahlreiche Organellen erkennen. Während die vollständig abgebildete Zelle in der Bildmitte neben einigen Fetttropfen zahlreiche Mitochondrien erkennen läßt, ist in der nur teilweise abgebildeten Zelle links oben sehr gut der Zellkern und das endoplasmatische Retikulum zu erkennen.

Abb.2b zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme einer Hepatocytensuspension ebenfalls nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C. Die Zellen haben sich abgerundet, Verunreinigungen mit "Nicht-Parenchymzellen", die bei der Rattenleber 30% ausmachen (88), sind nicht zu erkennen. Links oben erkennt man eine zweikernige, durch Trypanblau anfärbbare Zelle.

2.5. Lichtmikroskopische Untersuchungen an Hepatocyten nach Inkubation mit verschiedenen Zusätzen

Morphologische Untersuchungen der perfundierten Rattenleber bzw. isolierter Hepatocyten unter dem Einfluß des Verbrennungstoxins sind in der Literatur beschrieben (20,31,35-41). In (85) wird davon berichtet, daß isolierte Hepatocyten nach Inkubation mit dem Ver-



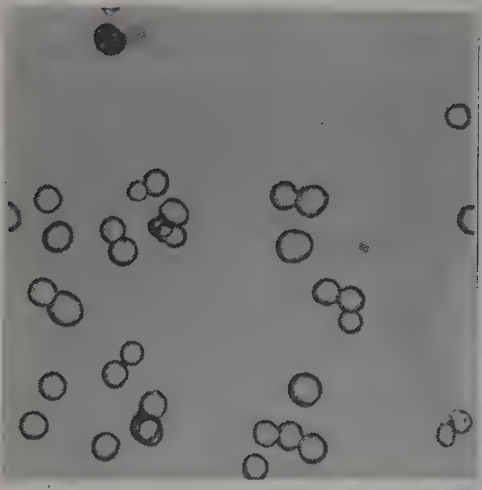


Abb.2a (oben):
Elektronenmikroskopische Aufnahme isolierter Hepatocyten

Abb.2b (links):
Lichtmikroskopische Aufnahme isolierter Hepatocyten

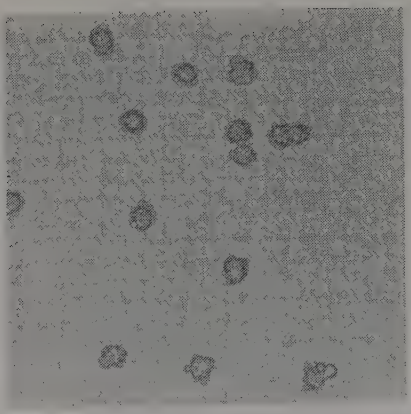


Abb.3a:
Hepatocyten nach 60 Minuten Inkubation mit Phalloidin
Vergrößerung: 200 fach

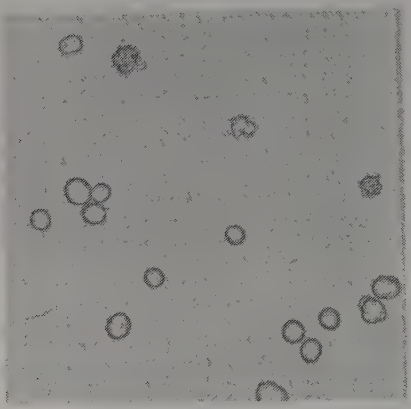


Abb.3b:
Hepatocyten nach 60 Minuten Inkubation mit Verbrennungstoxin
Vergrößerung: 200 fach

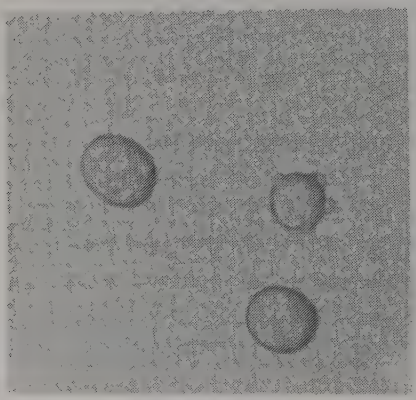


Abb.3c:
Hepatocyten nach 60 Minuten Inkubation mit Nativ
Vergrößerung: 500 fach

brennungstoxin zahlreiche Protrusionen zeigten. Diese Veränderungen sind auch lichtmikroskopisch erfaßbar. Zu 5 ml Zellsuspension (30 x 10^6 Zellen) wurden verschiedene Inkubationszusätze gegeben: 200 µl 0,9% NaCl als Kontrolle, 5 mg VT, 5 mg dessen native Vorstufe (="Nativ"), 50 µl Destillat, 100 µl Dialysat I. Da von Phalloidin bekannt ist, daß es an isolierten Hepatocyten ausgeprägte Protrusionen hervorruft (86), wurde eine mit Phalloidin inkubierte Hepatocytenprobe ebenfalls untersucht (=positive Kontrolle). Nach 60 Minuten Inkubation wurden die Ansätze - nach Vorbehandlung mit Glutaraldehyd und OsO_4 - lichtmikroskopisch untersucht: Phalloidin vorbehandelte Zellen (Abb.3a) zeigten die in der Literatur beschriebene starke Neigung zur Bildung von Protrusionen: 85-95% aller Zellen waren davon betroffen, gleichzeitig waren diese Zellen aber gegenüber Trypanblau nicht empfindlicher als Kontrollzellen. In Abb.3c - bei stärkerer Vergrößerung - mit Nativ vorbehandelte: Man erkennt in beiden Fällen neben ungeschädigten Zellen einige mit Protrusionen, die auch, in etwa gleichem Ausmaß, bei den Inkubationen mit Destillat und Dialysat zu verzeichnen waren. Ebenso war die Kochsalzgruppe nicht frei davon. Eine quantitative Auswertung der erhaltenen Bilder ergibt, daß die beschriebenen Protrusionen nach Inkubation mit VT zwar bestätigt werden konnten, allerdings war ihr Ausmaß kaum von dem anderer Ansätze, auch der Kontrolle, zu unterscheiden. Vor allem wurde das Ausmaß der Phalloidinschädigung auch nicht annähernd erreicht.

2.6. Trypanblautest nach Inkubation mit verschiedenen Zusätzen

Diese Versuche wurden durchgeführt, um einen ersten Überblick über mögliche Störungen der Membranstruktur durch den Zusatz von Extrakten aus verbrannter und unverbrannter Haut zu bekommen: Zu 5 ml Zellsuspension (3 x 10^6 Zellen/ml) wurden jeweils 200 µl Inkubationszusätze in den in Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen

gegeben. Die Vitalität der Zellen wurde nach 75 und 150 minütiger Inkubation bei 37°C untersucht. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, unterscheiden sich die gemessenen Werte nur geringfügig. Inkubation der Zellen mit Antimycin A, einem Inhibitor des Elektronentransportes in der Atmungskette, bewirkt eine 100%ige Anfärbbarkeit der Zellen.

	75 min	150 min
NaCl (0,9%)	81,5± 6,2	81,3± 5,0
VT (10 mg/ml)	84,2± 1,4	79,1± 2,3
Nativ (10 mg/ml)	82,1± 6,9	81,5± 3,6
Dialysat I	85,0± 1,5	83,2± 2,1
Antimycin A		0

Tabelle 1 : Anteil der nicht mit Trypanblau anfärbbaren Zellen (in Prozent) nach verschiedenen Inkubationszeiten (n=5).

2.7. Enzymabgabe ins Medium nach Inkubation mit verschiedenen Zusätzen (53,69,51,92-96)

Das Austreten zellständiger Enzyme deutet auf eine Schädigung der Zellen hin. In dieser Versuchsreihe wurde die Enzymabgabe in das Medium nach Inkubation mit verschiedenen Zusätzen untersucht. Dabei wurde die Aktivität von GlDH (mitochondrienspezifisch), GOT (kommt in den Mitochondrien und im Cytoplasma vor), sowie der beiden cytoplasmatischen Enzyme LDH und GPT bestimmt: Zu 5 ml Zellsuspension (ca. 3 x 10^6 Zellen/ml) wurden jeweils 200 µl Inkubationszusätze (in der gleichen Konzentration wie bei 2.6.) gegeben. Die Inkubation wurde nach 30 bzw. 60 Minuten gestopt und die Enzymaktivitäten wurden in den Zellen und im Überstand bestimmt. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, haben die untersuchten Inkubationszusätze keinen Einfluß auf das Ausmaß

der Enzymabgabe in das Medium. Andererseits kann man aber erkennen, daß eine genügende Sauerstoffversorgung während der Inkubation eine unabdingbare Voraussetzung für die Vitalität der isolierten Zellen darstellt.

	GlDH		GOT	
	30	60	30	60
NaCl (begast)	1,8±0,05	1,8±0,30	3,9±0,4	5,5±0,4
NaCl (unbegast)	---	---	---	70,4
VT	1,4±0,12	2,0±0,19	4,6±0,2	6,1±0,3
Nativ	1,5±0,21	2,1±0,41	4,3±0,4	5,0±0,3
Dialysat 1	1,5±0,1	1,9±0,11	4,9±0,1	6,1±0,1

	GPT		LDH	
	30	60	30	60
NaCl (begast)	7,0±0,5	13±1,0	15,5±2,1	19,0±2,1
NaCl (unbegast)	---	82,2	---	74,9
VT	9,5±1,3	12,2±1,8	21,2±3,4	18,3±2,4
Nativ	8,2±2,1	12,6±2,6	14,4±2,6	16,2±1,8
Dialysat 1	9,1±1,7	10,2±1,9	19,6±1,7	20,1±1,8

Tabelle 2: Prozentuale Verteilung der Enzymaktivitäten (Zelle/Überstand) nach 30 bzw. 60 Minuten Inkubation bei 37°C. Angegeben ist der Prozentsatz der in das Medium abgegebenen Enzymaktivitäten (n=4)

2.8. Proteinbiosynthese (54,60,67,97-102)

Nach schweren Verbrennungen ist der Serumproteinspiegel über einen längeren Zeitraum drastisch reduziert. Da die Serumproteine hauptsächlich in der Leber synthetisiert und anschließend in den Blutstrom sezerniert werden, erschien es sinnvoll der Frage nachzugehen, ob Extrakte aus verbrannter und unverbrannter

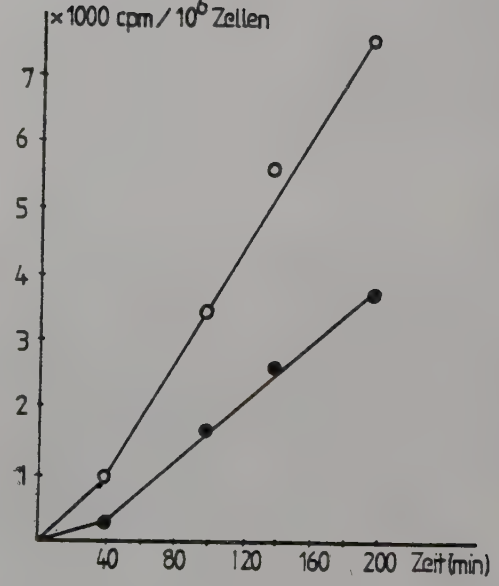


Abb.4a: Einbau von ^{14}C-Valin in TCA-fällbares Protein

—●—●— 0,5 µCi ^{14}C-Valin

—○—○— 1,0 µCi ^{14}C-Valin

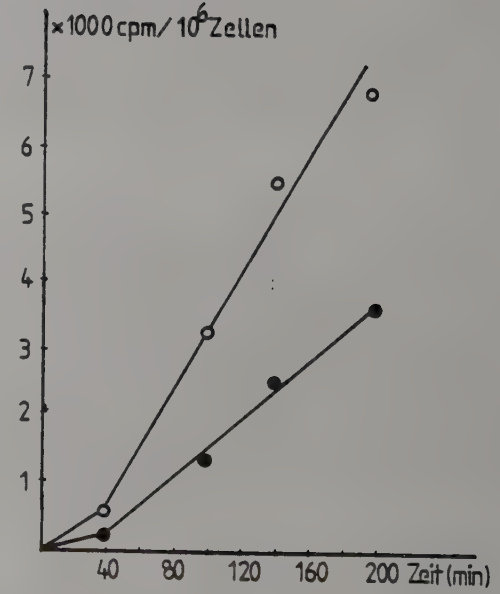


Abb.4b: Einbau von ^{14}C-Aminosäuregemisch in TCA-fällbares Protein

—●—●— 0,5 µCi ^{14}C-AS

—○—○— 1,0 µCi ^{14}C-AS

Haut einen Einfluß auf deren Syntheserate haben. Zur Ausarbeitung guter Testbedingungen wurden die isolierten Zellen mit verschiedenen radioaktiv markierten Vorstufen (^{14}C-Valin bzw. ^{14}C-Aminosäuremischung) in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Abb.4a und 4b zeigen die dabei erhaltenen Ergebnisse: In beiden Fällen wurden 4 ml Zellsuspension ($3{,}2 \times 10^6$ Zellen/ml) mit unterschiedlichen Mengen der radioaktiv markierten Vorstufen inkubiert. Wie aus den Abbildungen ersichtlich, verläuft die Proteinsynthese nach einer Anlaufphase mindestens 200 Minuten linear. Der Einbau der radioaktiv markierten Aminosäuren ist proportional zur angebotenen Konzentration. Es zeigte sich auch, daß gleiche µCi Valin bzw. Aminosäuremischung gleiche Einbauraten ergeben.

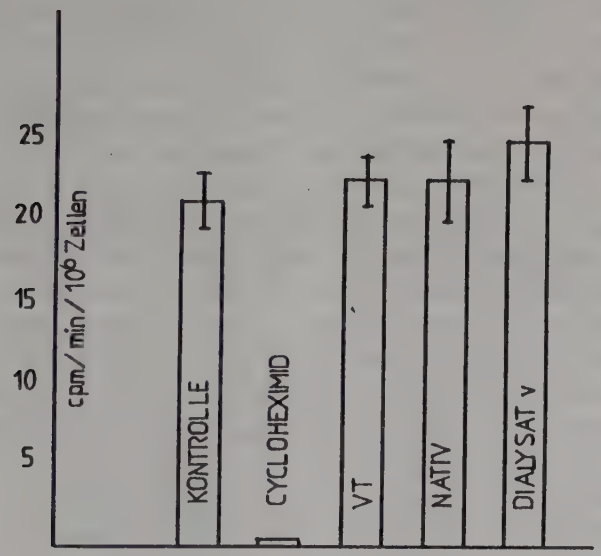


Abb.5: Einbau von 0,5 µCi ^{14}C-Valin nach Inkubation mit verschiedenen Zusätzen (n=5).

Aus diesen gewonnenen Daten wurde das eigentliche Testsystem wie folgt gewählt: Zu 3 ml Zellsuspension wurden je 100 µl Inkubationszusätze gegeben (Kontrolle: 0,9% NaCl; Cycloheximid: 10 mg/ml; VT und Nativ: 50 mg/ml). Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 0,5 µCi ^{14}C-Valin gestartet und über 150 Minuten verfolgt. In Abbildung 5 sind die dabei erhaltenen Einbauraten pro Minute pro 10^6 Zellen miteinander verglichen. Zur Berechnung wurde der Einbau in der Zeit zwischen der 60. und 120. Minute herangezogen. Cycloheximid hatte den erwarteten starken Hemmeffekt, während die andereen Hautextrakte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine reduzierten Syntheseraten aufweisen.

2.9. RNA-Synthese (53,69,103-105)

Der Einbau von ^{14}C-Uridin in die RNA nach Inkubation der Leberzellen mit verschiedenen Zusätzen wurde untersucht. In Abb.6 ist eine typische Verlaufsform wiedergegeben: Die Inkubation wurde einmal unter Carbogenbegasung, das andere Mal ohne Carbogenbegasung durchgeführt. Von Beginn der Inkubation an erkennt man im zweiten Fall eine deutlich reduzierte Syntheserate, was einmal mehr die starke Abhängigkeit der isolierten Hepatocyten von einer ausreichenden Sauerstoffversorgung demonstriert. Darüber hinaus sieht man, daß der Uridineinbau nur über eine recht kurze Zeitspanne linear verläuft.

Für vergleichende Untersuchungen nach Inkubation der Hepatocyten mit verschiedenen Zusätzen wurde die Einbaurate nach 30 Minuten bestimmt. An Inkubationszusätzen wurden verwendet: Je 200 µl 0,9% NaCl (Kontrolle); VT und Nativsuspension (50 mg/ml); α Amanitin (100 µg/ml); Galaktosamin und Glucosamin (je 15 mg/ml); 10-200 µl Penicillin/Streptomycinlösung, 100-200 µl Dialysat aus verbrannter und unverbrannter Haut, mit 0,9% NaCl auf 200 µl ergänzt. Da die Werte der einzelnen Versuchsserien schwankend waren, wurden die Einbauraten der mit verschiedenen Zusätzen

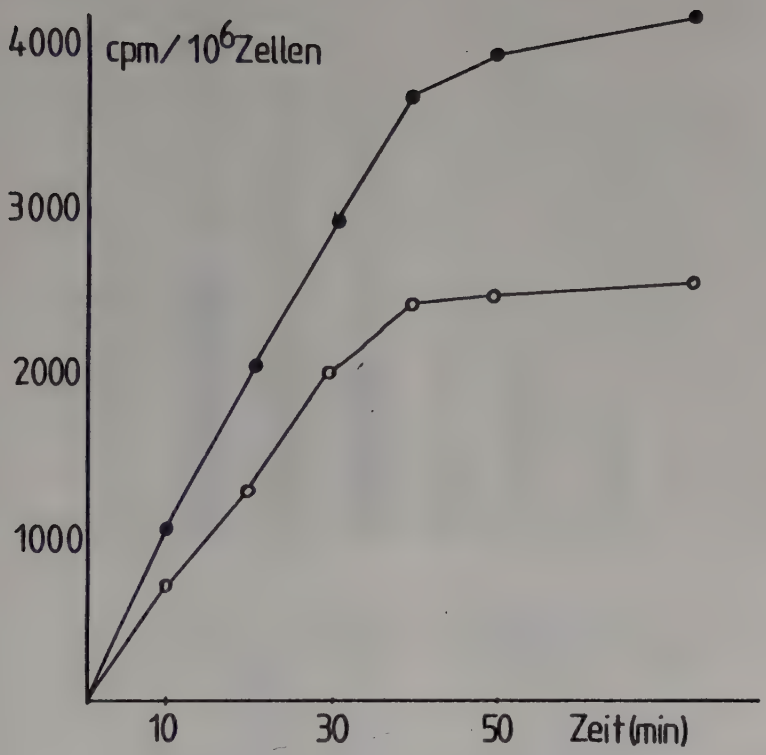


Abb.6: Einbau von je 0,375 µCi ^{14}C-Uridin in TCA-fällbare RNA. (3 ml Zellsuspension; ca. 2,5 x 10^6 Z./ml)
—o—o— Inkubation ohne Carbogenbegasung
—●—● Inkubation unter Carbogenbegasung

inkubierten Hepatocytensuspensionen jeweils direkt mit der Kontrollgruppe verglichen. Abb.7 zeigt die dabei erhaltenen Ergebnisse. α-Amanitin, ein spezifischer Hemmstoff einiger eukaryontischer RNA-Polymerasen,

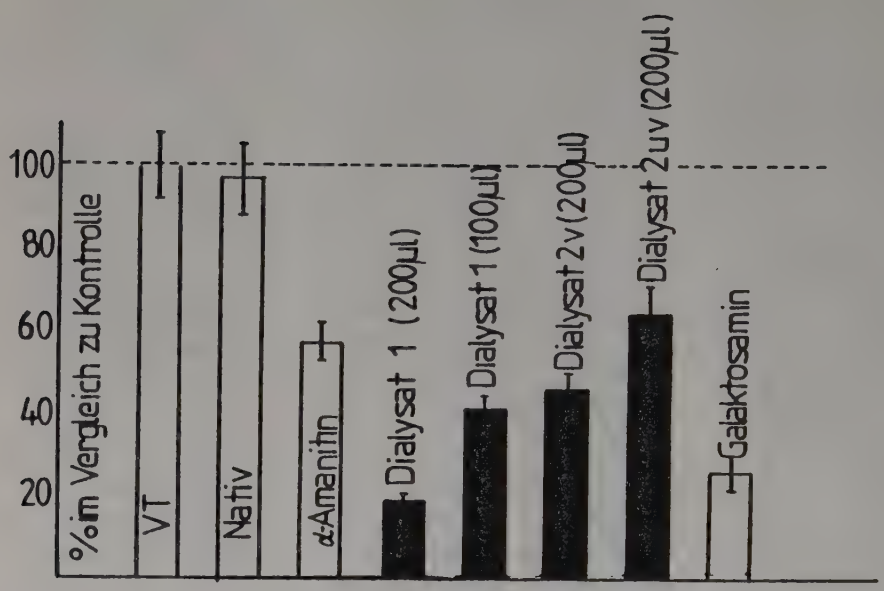


Abb.7: RNA-Syntheseraten verschiedener Inkubationszusätze im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=3-6)

wurde als positive Kontrolle mitgeführt und zeigte die erwartete Hemmwirkung. Das Verbrennungstoxin sowie seine native Vorstufe zeigten keinerlei Wirkung.

Ein sehr deutlicher Hemmeffekt war hingegen bei Inkubation der Zellen mit Dialysaten aus verbrannter und unverbrannter Haut festzustellen. Inkubation mit 200 µl Dialysat 1 aus verbrannter Haut bewirkte eine Reduzierung der Einbaurate auf etwa 20%, bei Inkubation mit 100 µl auf etwa 40%. Zur Absicherung der erhaltenen Ergebnisse wurde eine weitere Präparation zur Herstellung der dialysierbaren Anteile durchgeführt: 22 Mäusehäute (vgl.Dialysat 1:55 Häute), einmal aus verbrannter Haut, das andere Mal aus unverbrannter Haut,

wurden zur Herstellung verwendet. Dabei konnten die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe bestätigt werden: Neben dem Dialysat aus verbrannter Mäusehaut zeigte aber auch das Dialysat aus unverbrannter Haut einen hemmenden Effekt. Offensichtlich handelt es sich also um eine oder um mehrere Substanzen, die durch Freisetzung aus dem Gewebe wirksam ist (sind), und nicht erst unter dem Einfluß thermischer Energie neu gebildet wird (werden). Die etwas höhere Aktivität der Fraktion aus verbrannter Haut könnte damit erklärt werden, daß es unter der Einwirkung der Hitzeenergie zu einer verstärkten Gewebszerstörung kommt und damit zu einer erleichterten Freisetzung im Vergleich zum unverbrannten Gewebe.

Festgestellt wurde, daß es beim Erhitzen zu einem Aktivitätsverlust kommt, siehe Abb.8:

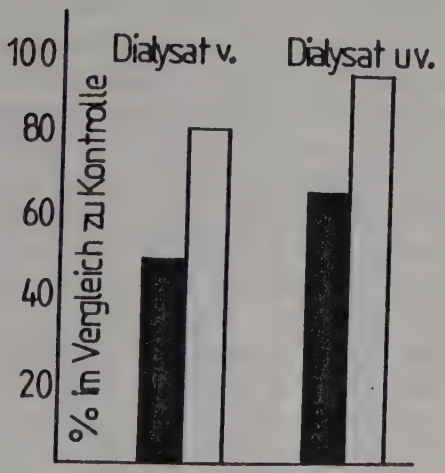


Abb.8: Aktivität der Dialysatfraktionen vor und nach Hitzedenaturierung im Vergleich zur Kontolle.
■ vorher ▭ nachher

1 ml Dialysat aus verbrannter bzw. unverbrannter Haut wurde bei 170-200°C zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Aqua bidest. gelöst. Mit dieser Fraktion wurde dann der RNA-Test durchgeführt: Dialysat aus verbrannter Haut, das vor der Hitzeeinwirkung eine Reduzierung der Einbaurate gegenüber der NaCl-Gruppe auf ca. 54% bewirkte, zeigte nach der Hitzeeinwirkung bereits 83% der Syntheseleistung der Kontrollgruppe. Die entsprechenden Werte des Dialysats aus unverbrannter Haut lagen bei 73% vor Hitzeeinwirkung bzw. 96% nach Hitzeeinwirkung. Offensichtlich führt die erhöhte Temperatur zu einer Denaturierung der aktiven Komponente(n). Denkbar wäre natürlich auch, daß es bei diesen Temperaturen zu einer Verflüchtigung der inhibierenden Bestandteile kommt.

Von Galaktosamin ist bekannt, daß es eine hemmende Wirkung auf den Einbau von Uridin in die RNA besitzt (103). Da es in den Polysaccharidanteilen der Membranstrukturen in relativ großen Mengen vorhanden ist, wurde von der Hypothese ausgegangen, daß es bei Zerstörung der Haut, insbesondere nach Verbrennungen, freigesetzt werden könnte. Es schien möglich, daß es sich bei den aktiven Anteilen der Dialysatfraktionen um Galaktosamin handeln könnte. Aus diesem Grunde wurde auch der Einfluß von Galaktosamin auf die RNA-Synthese untersucht. Dabei zeigte sich aber, daß man zur Erzielung gleich starker Inhibitionen mit Galaktosaminkonzentrationen arbeiten muß, wie sie im Dialysat mit Sicherheit nicht vorliegen. Somit scheidet Galaktosamin als hauptsächliche Hemmsubstanz der Dialysatfraktion wahrscheinlich aus; allerdings ist es möglich, daß es eine von vielleicht mehreren aktiven Komponenten des Dialysats darstellt. Außerdem ist aus der Literatur bekannt, daß Endotoxin einen potenzierenden Effekt auf dieGalaktosaminwirkung ausübt - eine Endotoxinkontamination des Dialysats kann nicht ausgeschlossen werden.

Um bakterielle Kontaminationen während der Aufarbeitung

des Dialysats zu vermeiden, wurde diese in Gegenwart von Penicillin und Streptomycin durchgeführt (siehe 5.2). Deshalb wurde überprüft, ob nicht die Antibiotica für die reduzierte Syntheserate verantwortlich sind. Durch die folgenden Ergebnisse konnte das aber ausgeschlossen werden: Während 200 µl Antibioticalösung, dem üblichen Testsystem zugegeben, noch eine Reduzierung der Syntheseleistung auf 76±7,1% gegenüber den Kontrollgruppen bewirkte, reduzierte sich diese Hemmung bereits auf 94,6 ± 5,4% bei Verwendung von 100 µl. 10 µl Antibioticalösung, etwa soviel Penicillin und Streptomycin enthaltend wie 200 µl Dialysat, hatte keinen hemmenden Einfluß mehr auf die RNA-Synthese. Glucosamin war ebenfalls ohne hemmenden Einfluß.

2.10. Gluconeogenese (67,93,102,106,109-112)
Schölmerich (148) fand an der perfundierten Rattenleber von mit VT vorbehandelten Tieren bzw. nach Verbrennungen eine reduzierte Gluconeogenese.

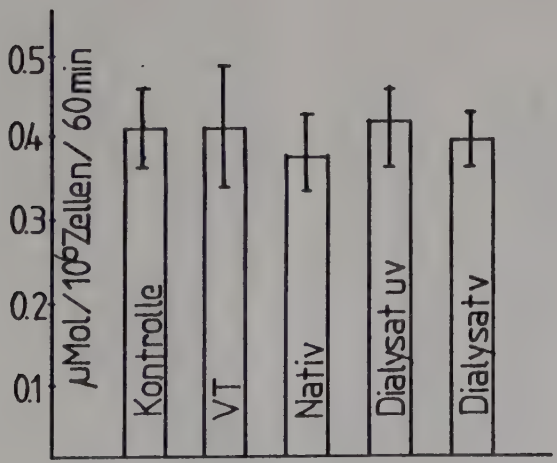


Abb.9: Einfluß verschiedener Hautextrakte auf die Gluconeogenese (n=4)

Diesen Effekt zeigten auch isolierte Hepatocyten von mit VT vorbehandelten Ratten. Hingegen wurde bei Direktinkubation mit dem VT keine Reduzierung beobachtet (85). Dieser Befund konnte bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Gluconeogenese an isolierten Hepatocyten bestätigt werden. Wie aus Abb.9 zu entnehmen ist, zeigten auch die anderen Extrakte verbrannter und unverbrannter Haut keine Hemmung der Gluconeogenese.

2.11. Harnstoffsynthese (102,106-108)
Auch bei dieser ATP-abhängigen Stoffwechselreaktion stellte Schölmerich bei Untersuchungen an der perfundierten Rattenleber fest, daß nach Verbrennungen bzw. bei mit Toxin vorbehandelten Tieren eine reduzierte Syntheserate zu beobachten war (148). Dieser Befund steht allerdings in Widerspruch zu den Ergebnissen Schönenbergers, der nach Applikation von VT eine erhöhte Aus-

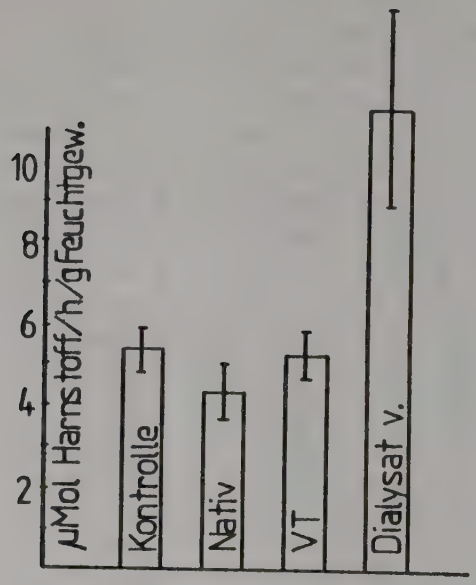


Abb.10: Einfluß verschiedner Hautextrakte auf die Harnstoffsynthese (n=4)

scheidung von Harnstoff beobachten konnte (in vivo-Versuch an der Maus, (43)). Direkte Inkubation der Hepatocyten mit dem VT lieferten bei den Untersuchungen Schölmerichs eine - allerdings nicht signifikante - Erniedrigung der Harnstoffsynthese (85). Dieser Versuch wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit wiederholt; zusätzlich zum VT wurde der Einfluß von Dialysat aus verbrannter Haut untersucht. Wie aus Abb.10 zu entnehmen ist, verursachen weder das VT noch seine native Vorstufe eine signifikante Reduzierung der Syntheserate. Hingegen bewirkt die Inkubation mit dem Dialysat verbrannter Haut eine starke Erhöhung der Harnstoffsynthese. Dies ist offensichtlich auf die vorhandenen niedermolekularen harnstoffpflichtigen Substanzen zurückzuführen.

2.12. Bestimmung von ATP/ADP/AMP und des ATP/ADP-Quotienten (53,69,93,96,102,115)

Schölmerich (148) konnte zeigen, daß an der perfundier-

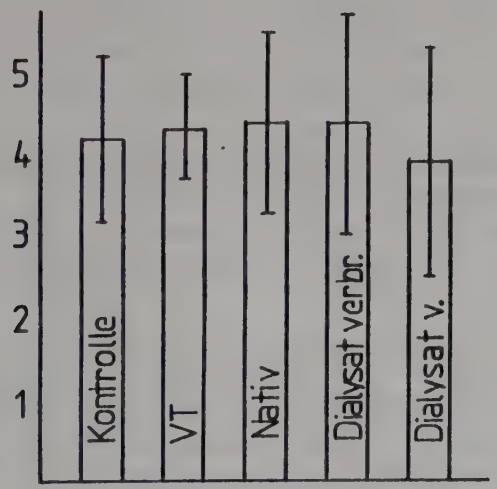


Abb.11: ATP/ADP-Quotient von Hepatocyten, die mit verschiedenen Hautextrakten 60 Minuten inkubiert wurden (n=3).

ten Rattenleber von Tieren, die mit VT vorbehandelt wurden - ähnlich wie bei verbrannten Tieren - der ATP/ADP-Quotient im Vergleich zu Kontrollgruppen stark reduziert war. In der folgenden Untersuchung sollte geprüft werden, ob auch bei der direkten Inkubation mit dem VT und anderen Hautextrakten solch eine Verminderung festzustellen ist. Die Adeninnucleotide wurden nach 60 Minuten Inkubation unter den üblichen Bedingungen bestimmt. Tabelle 3 und Abb.11 zeigen die dabei erhaltenen Ergebnisse: Zwischen den Kontrollgruppen und den mit verschiedenen Hautextrakten inkubierten Ansätzen waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

	ATP	ADP	AMP
NaCl	14,6±2,5	3,74±1,6	0,87±0,1
VT	15,0±3,7	3,56±1,3	0,73±0,13
Nativ	15,1±2,4	3,74±1,6	1,20±0,6
Dialysat v.	16,7±2,3	4,15±1,7	1,16±0,35
Dialysat uv.	15,5±1,7	4,48±2,2	1,15±0,36

Tabelle 3: Adeninnucleotidgehalt der Hepatocyten nach 60 Minuten Inkubation (nMol/mg Protein)

2.13. Messung verschiedener Atmungsparameter an Hepatocyten (52,53,69,92,93,89,109)

Die Messungen erfolgten polarographisch mittels einer modifizierten Clark-Elektrode nach Delieu und Walker (83).

2.13.1. Messung der Basisatmung

4-5 ml Zellsuspension (2-3,5 x 10^6 Zellen/ml) wurden mit verschiedenen Hautextrakten unter Begasung 120 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 1 ml der Zellsuspension entnommen, kurz zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in

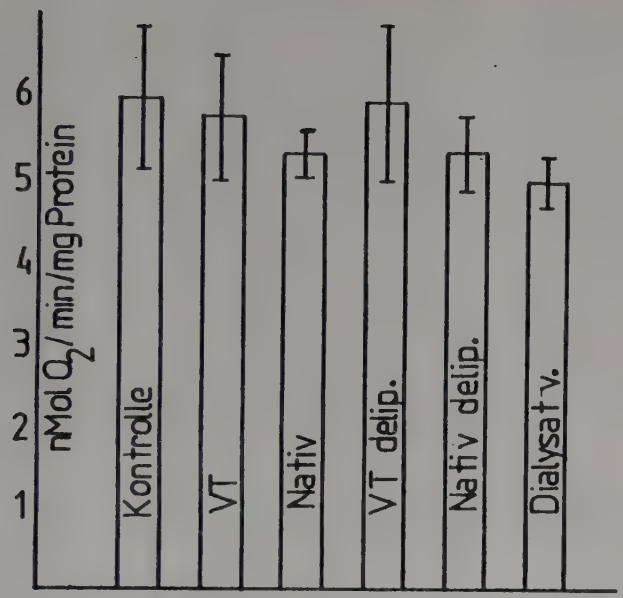


Abb.12: Atmungsraten isolierter Hepatocyten nach 120 Minuten Inkubation bei 37°C (n=3)

1 ml Atmungsmedium (luftgesättigte Hanks-Lösung) resuspendiert und der Sauerstoffverbrauch bei 25°C polarographisch über einen angeschlossenen Schreiber registriert. Aus Abb.12 geht hervor, daß die zugegebenen Inkubationszusätze keinen signifikanten Einfluß auf die registrierte Atmung ausübten.

2.13.2. Beeinflussung der Hepatocytenatmung durch Succinat

Zugabe von Succinat zu isolierten Mitochondrien bewirkt eine Überführung der Basisatmung in die Status 4 Atmung. Bei Hepatocyten mit intakter Membranstruktur verändert sich hingegen die Basisatmung nach Zugabe

einer 1-2 mmolaren Succinatlösung nicht. Somit kann über die Atmungsstimulierung eine Aussage über die Integrität der Plasmamembran erhalten werden. Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Hepatocyten zeigten unmittelbar nach der Isolierung meist Werte um 1,1. Untersucht man Hepatocyten, die längere Zeit bei 37°C unter Carbogenbegasung inkubiert wurden, so kann man feststellen, daß sich im Verlaufe der Inkubation die Messwerte immer mehr in Richtung des Idealwertes 1,0 verschieben. Obwohl mit zunehmender Dauer immer mehr Zellen zerstört werden, erholen sich die übriggebliebenen offensichtlich von den ev. aufgetretenen Schäden bei der Zellisolierung. Die aus den beschädigten Zellen ausgetretenen Mitochondrien werden durch Temperaturen um 37°C bald zerstört. In Tabelle 4 sind die Werte der Succinatstimulierbarkeit wiedergegeben: Man kann dabei erkennen, daß die mit delipidiertem Nativ bzw. VT inkubierten Hepatocyten deutlich längere Zeit benötigen, um zum Werte 1,0 zu gelangen, was darauf hinweisen könnte, daß von diesen Substanzen eine Membranschädigung verursacht wird. Einschränkend muß aber gesagt werden, daß diese beiden Fraktionen vor ihrem Einsatz mit SDS behandelt wurden; obwohl sie vor der Hepatocyteninkubation ausgiebig dialysiert wurden, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, daß sämtliche SDS-Spuren damit beseitigt sind.

	40'	100'	150'
NaCl	1,1±0,02	1,0	1,0
VT	1,1±0,02	1,08±0,02	1,0
Nativ	1,08±0,03	1,06±0,04	1,0
Dial.v.	1,08±0,05	1,02±0,01	1,0
VT delip.	1,39±0,12	1,21±0,11	1,0
Nat.delip.	1,39±0,1	1,17±0,1	1,0

Tabelle 4: Werte der Succinatstimulierbarkeit nach 40,100 und 150 Minuten Inkubation (n=3)

2.14. Einfluß von Glucagon auf die Gluconeogenese (67,106,112)

Als primärer Angriffspunkt der VT-Wirkung wurde gelegentlich die Zellmembran, und hier insbesondere Hormonrezeptoren, in Erwägung gezogen (5). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde als Beispiel der Einfluß des Glucagons und dessen mögliche Beeinflussung durch das VT herangezogen. Die Syntheserate von Glucose unter dem Einfluß von Glucagon (10^{-6} molar) im Vergleich zu Kontrollgruppen wurde unter dem Einfluß verschiedener Inkubationszusätze untersucht. Wie aus Tabelle 5 zu entnehmen ist, sprechen die Zellen sehr gut auf das Hormon an, was durch die deutlich gesteigerte Syntheseleistung zu erkennen ist. Allerdings konnte keiner der mitgeführten Hautextrakte die Hormonstimulierung blockieren.

	ohne Glucagon	mit Glucagon	Faktor
NaCl	0,427	1,08	2,54
VT	0,524	1,34	2,56
Nativ	0,455	1,28	2,81
Dialysat v.	0,465	1,10	2,36
Dialysat uv.	0,470	1,23	2,62

Tabelle 5: Einfluß von Glucagon (10^{-6} molar) auf die Gluconeogenese (μMol Glucose/60min/10^6Zellen)

2.15. Atmungsmessungen an Mitochondrien

2.15.1. Messungen an vorbehandelten Tieren

In diesem Abschnitt werden Versuche beschrieben, bei denen die Atmungsleistungen von Mitochondrien untersucht wurden. Die Verwendung von Mitochondrien vorbehandelter Tiere als Testsystem scheint im Gegensatz zur Verwendung von Hepatocyten insoferne gerechtfertigt zu sein, da deren Isolierung vergleichsweise recht scho-

nend verläuft. Vor allem stellt sich in diesem Falle nicht das Problem der Herauslösung aus einem zusammenhängenden Verband mit der Gefahr einer Membranschädigung. Mitochondrien vorbehandelter Tiere sind in der Literatur häufig als Test- und Versuchssystem beschrieben (z.B. 76,116,117).

Ratten (200-250 g; Altromin-Futter bis 24 Stunden vor Versuchsbeginn ad libitum) wurden die nachfolgend angeführten Substanzen i.p. verabreicht und deren Lebern nach 4 Tagen entnommen:

VT: 100 mg/3 ml 0,9% NaCl; Nativ: 100 mg/3 ml; Homogenat aus verbrannter Haut: 150mg/3 ml; Homogenat aus unverbrannter Haut: 150 mg/3 ml; Destillat, Fraktion1: 0,75 ml mit 1,5 ml 0,9% NaCl verdünnt; Dialysat 2: 1,5 ml Destillat aus verbrannter + 1,5 ml Destillat aus unverbrannter Haut; Endotoxin: 6 mg/3 ml 0,9% NaCl.

Die Isolierung der Mitochondrien und die Durchführung der Atmungsmessungen sind im Abschnitt 5 beschrieben.

In Tabelle 6 sind die Atmungsraten der Basisatmung und der Status 3 und Status 4 Atmung nach Zugabe von Succinat und α-Ketoglutarat angegeben.

	BasisA.	Suc.	Ketogl.	Suc+ADP	Keto+ADP
Kontrolle	4,0±0,3	15,5±2,5	6,0±0,2	81,6±2,1	41,6±4,2
Destillat	5,0±0,6	17,2±1,5	6,0±0,3	82,7±6,1	43,4±7,1
Dialysat	3,8±0,2	14,9±1,0	4,9±0,3	72,4±4,5	36,0±8,2
VT	3,8±0,4	14,3±1,0	4,8±0,2	74,0±7,3	35,3±6,1
Nativ	4,5±0,2	17,2±1,6	6,0±1,1	86,6±7,5	42,6±9,1
Hom.verbr.	4,1±0,5	15,6±1,3	5,3±0,2	74,1±9,3	40,2±4,3
Hom.uv.	4,5±1,3	17,6±1,7	6,1±1,0	83,3±1,4	43,0±6,2
Endotoxin	4,5±0,2	17,1±9,0	5,8±0,1	77,4±7,1	39,5±5,1

Tabelle 6: Verbrauch nMol O_2/mg Protein/min unter verschiedenen Atmungsbedingungen (vorbehandelte Ratten) (n=4)

Wie daraus ersichtlich, liegen die Werte vorbehandelter und nicht vorbehandelter Tiere etwa in den gleichen Größenordnungen. In Abbildung 13 sind die Werte der Atmungskontrollkoeffizienten, in Abbildung 14 die der P/O-Quotienten widergegeben. Auch hier zeigen sich kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Etwas überraschend zeigen die Mitochondrien von mit Destillat vorbehandelten Tieren keine Abweichungen von der Kontrollgruppe. Dies ist insoferne erwähnenswert, da das Destillat bei direkter Inkubation sehr wirksam war (siehe 2.16.2.).

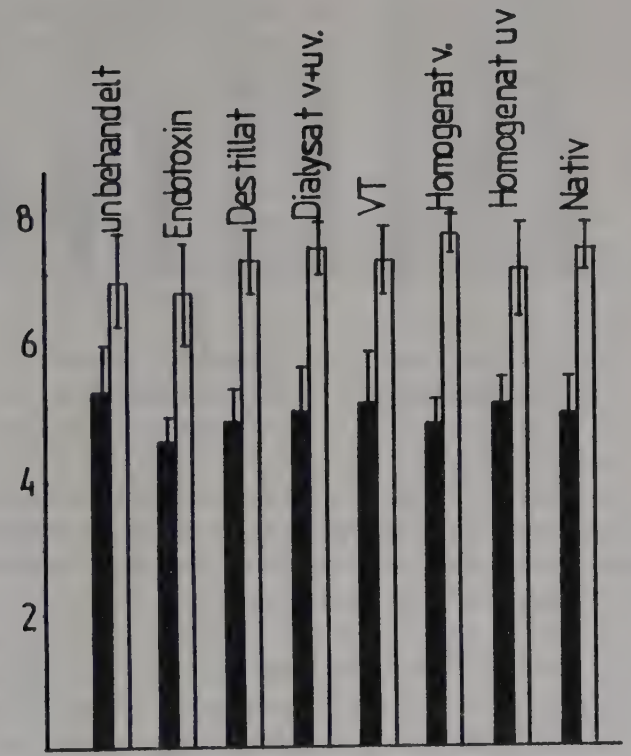


Abb.13: ACR vorbehandelter Ratten

Succinat Ketoglut

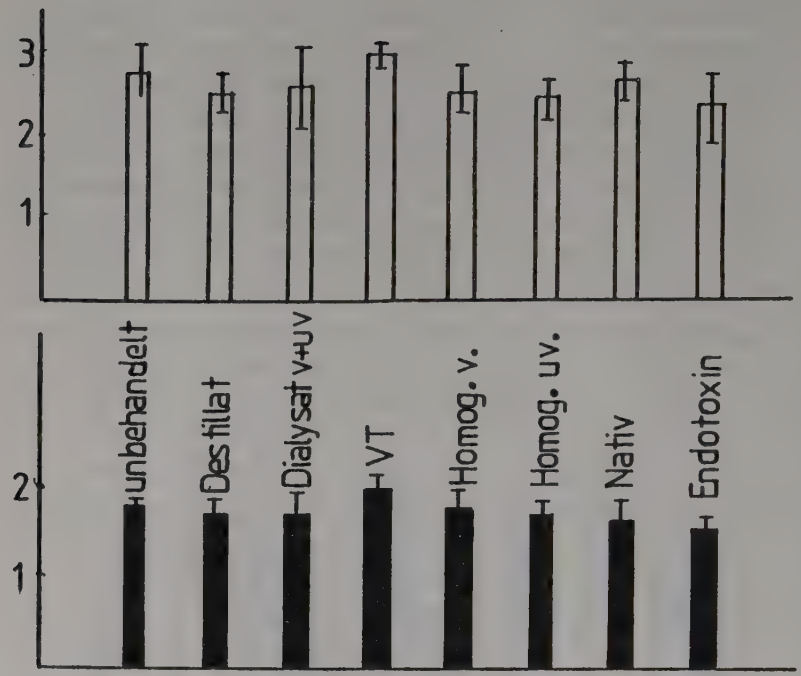


Abb.14: P/O-Quotienten vorbehandelter Tiere
Succinat Ketoglutarat

2.15.2. Direktinkubationen

Der Einfluß verschiedener Extrakte aus verbrannter und unverbrannter Haut auf die Atmung isolieter Mitochondrien wurde untersucht. Folgende Zusätze wurden zu 1 ml Mitochondriensuspension gegeben:
VT: 10 µl (15 mg/ml 0,9% NaCl); Nativ: 10 µl (15 mg/ml) Dialysat 2 aus verbrannter und unverbrannter Haut: je 5 µl; Destillat, Fraktion 1 und 2: je 5 µl; Endotoxin: 10 mg/ml; Delipidiertes VT und delipidiertes Nativ: je 12 mg/ml, jeweils 10 ml davon.
Mit Ausnahme der Destillatfraktionen hatte keiner der angegebenen Inkubationszusätze einen Einfluß auf die

Atmungseigenschaften der Mitochondrien: Weder die Basisatmung, noch die Status 4-Atmung nach Zugabe von Succinat oder α-Ketoglutarat bzw. der Atmungskontrollkoeffizient waren verändert. Nur die beiden Fraktionen des Destillats zeigten ausgeprägte Wirkungen, die im folgenden beschrieben werden: (Abb.15 a,b und Abb.16 a,b) Abb. 15a zeigt den Verlauf der Atmung ohne Zusatz von Destillat: Die Basisatmung wird durch Zugabe von Succinat auf den 3-4 fachen Wert gesteigert (Status 4 Atmung); die Zugabe von ADP bewirkt eine weitere Steigerung der Atmung (Status 3 Atmung). Die bei diesen Untersuchungen gefundenen Atmungskontrollkoeffizienten lagen meist zwischen 4,5 und 5,5, Abb.15b beschreibt nun die Verhältnisse, wenn den im Basismedium atmenden Mitochondrien Destillat zugefügt wird: Unmittelbar nach Zugabe kommt es zu einer kurzfristigen Erhöhung der Atmungsrate, die Mitochondrien kehren sehr bald aber wieder auf den Wert der Basisatmung zurück. Fügt man nun dem System Succinat zu, so kommt es zu einer 6-10 fachen Erhöhung der Atmungsrate gegenüber der Basisatmung. Durch Zugabe von ADP wird die Atmung nicht weiter gesteigert.

In Abb.16a,b sind die nach obigem Schema durchgeführten Versuche wiedergegeben, allerdings wurde anstelle von Succinat α-Ketoglutarat verwendet. Wie daraus zu entnehmen ist, laufen auch hier die bereits bei Verwendung von Succinat geschilderten Verhältnisse ab; insbesondere die Zugabe von ADP bewikte auch hier keine weitere Steigerung der Atmungsrate, wenn den Mitochondrien Destillat zugefügt wurde. Das Destillat enthält also offensichtlich eine Substanz mit stark entkoppelnder Wirkung.

Einen noch ausgeprägteren Einfluß auf die Mitochondrienatmung übte der Zusatz von Fraktion 2 des Destillates aus: Wie aus Abb.17 ersichtlich ist, läßt sich die Basisatmung nach Zugabe von Destillat weder durch Succinat (Ketoglutarat) noch durch ADP beeinflussen.

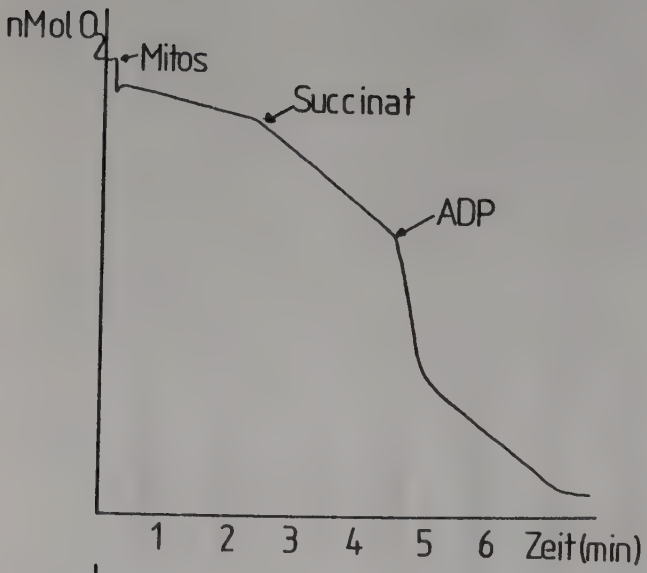


Abb.15a: Mitochondrien ohne Zusatz von Destillat (Kontrollversuch)

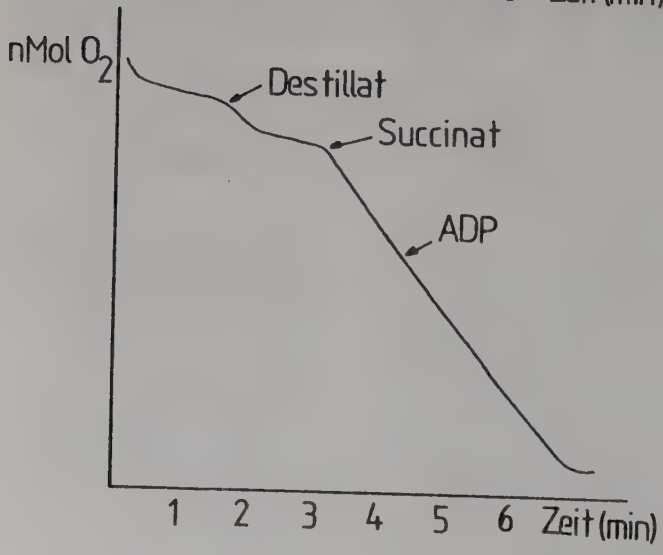


Abb.15b: Mitochondrien + Destillat

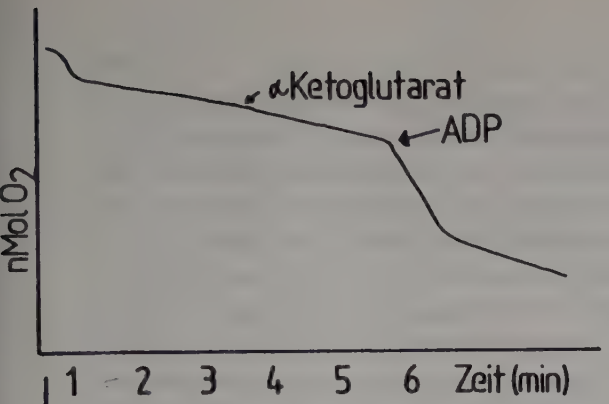


Abb.16a: Mitochondrien ohne Zusatz von Destillat (Kontrollversuch)

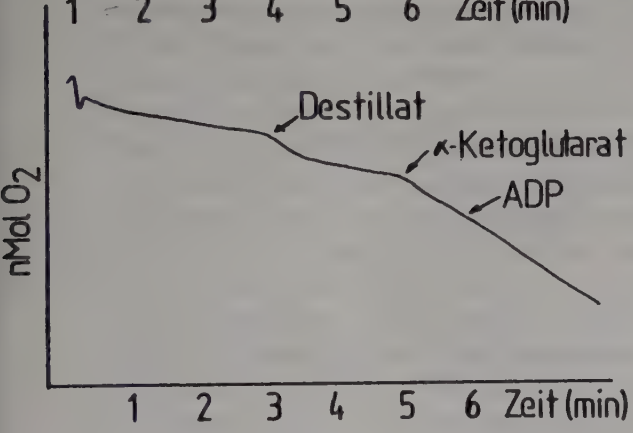


Abb.16b: Mitochondrien + Destillat

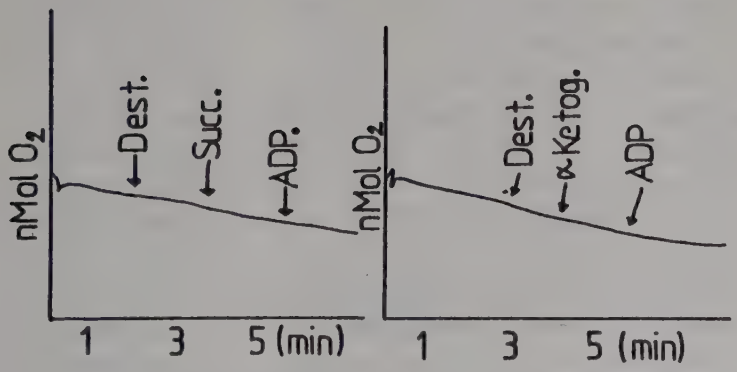


Abb.17: Einfluß von Destillat, Fraktion 2 auf die Mitochondrienatmung

3. DISKUSSION

Die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen wird durch eine strenge Koordination der einzelnen Teilschritte des Stoffwechsels ermöglicht. Zahlreiche Regulationsmechanismen, sowohl intrazellulärer Art (z.B.durch Anpassung der Enzymaktivitäten) als auch extrazellulärer Art (z.B.über veränderte Hormonausschüttung) stehen dem Körper zur Verfügung, um sich neuen Situationen anzupassen. Beim Verbrennungstrauma kommt es zu tiefgreifenden Beeinträchtigungen dieser Homöostase. Neben vielen anderen Komplikationen zählt die bakterielle Sepsis zu den gefürchtetsten Begleiterscheinungen jeder Verbrennung. Durch die Infektion kommt es zu einer Hyperthermie, wodurch die bereits bestehende katabole Stoffwechsellage des Organismus weiter erhöht wird. Ungünstig wirkt sich auch die Einschleusung bakterieller Exo- und Endotoxine aus. Exotoxine, die von den Bakterien sezerniert werden, sind wesentlich toxischer als Endotoxine. Gut charakterisiert ist die Wirkungsweise eines der Exotoxine von Pseudomonas aeruginosa, eines Bakteriums, das in der Verbrennungskrankheit eine bedeutende Rolle spielt: Es ist über die Blockierung der Proteinbiosynthese wirksam, wobei der Mechanismus ähnlich dem des Diphterietoxins ist (118). Dabei reicht ein Toxinmolekül aus, um eine Zelle abzutöten! Exotoxine verfügen über hohe antigene Eigenschaften. So wird von einem Antitoxin berichtet, daß nach Pseudomonasinfektionen bei Verbrennungen verarbreicht, eine deutlich reduzierte Letalitätsrate bewirkte (119). Auch den hitzestabilen Endotoxinen (LPS), die erst bei der Auflösung der Bakterienzelle freigesetzt werden, kommt wahrscheinlich bei der Verbrennungskrankheit einige Bedeutung zu. Neben ihrer Einschleußung über die verbrannte Wundfläche kommt es im Gefolge der nach Verbrennungen oft zu beobachtenden Darmparalyse im Intestinalbereich zu einer enormen Vermehrung der Bakterien mit anschlie-

ßender Resorption ihrer Endotoxine. Die Ausbildung einer Endoxinämie wird durch das nach Verbrennungen geschwächte RES noch erleichtert. Im Tierexperiment kann man nach Applikation von Endotoxinen verschiedenen Ursprungs Stoffwechselstörungen hervorrufen, wie sie teilweise auch nach Verbrennungen auftreten (121, 120).

Neben diesen Intoxikationen durch bakterielle Gifte, die im Verlaufe der Verbrennungskrankheit eine zentrale Rolle spielen, muß auch eine Intoxikation mit körpereigenen Giften in Betracht gezogen werden: Systematische Untersuchungen an Proteinen und Aminosäuren zeigten, daß durch die Einwirkung thermischer Energie zahlreiche toxische Verbindungen gebildet werden (122-126): CO, H_2S, HCN, NH_3, CS_2, biogene Amine, gesättigte und ungesättigte Aldehyde und Ketone, Kohlenwasserstoffe, polycyclische aromatische Verbindungen.

Aus Triglyceriden wird nach Applikation thermischer Energie das Auftreten freier Fettsäuren beschrieben (127), die ebenfalls zu Störungen des Stoffwechsels Anlaß geben können: Die freien Fettsäuren, die außerdem durch verstärkte Lipolyse, bedingt durch die hohen Katecholaminausschüttungen nach Verbrennungen, vermehrt auftreten, werden teilweise durch Coenym A zu LCFACoA verestert. Diese wirken als Inhibitor der Adeninnucleotidtranslocase, die den Austausch des Cytoplasmatischen ADP gegen das mitochondrial gebildete ATP katalysiert (128-131).

Die Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden führt zur vermehrten Bildung von Prostaglandinen, die vielfältige Stoffwechselveränderungen auslösen können (132). Auf die Freisetzung proteolytisch wirksamer Enzyme nach Verbrennungen wurde bereits hingewiesen.

Darüber hinaus berichten einige Arbeitsgruppen, daß ihnen die Isolierung spezieller Verbrennungstoxine gelungen sei (siehe dazu Abschnitt 1).

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, das in der Einleitung bereits ausführlich charakterisierte Verbrennungstoxin nach Schönenberger bezüglich seiner Wirkung auf den Leberstoffwechsel zu untersuchen. Obwohl dieses Verbrennungstoxin im Schrifttum der letzten Jahre eine zentrale Rolle für sich in Anspruch nahm (gelegentlich wurde sogar von "dem" Verbrennungstoxin gesprochen (42)), schien es aus mehreren Gründen sinnvoll, die Untersuchungen nicht allein auf dieses VT zu beschränken: Parallel zu den Experimenten mit dem Basler Verbrennungstoxin wurde deshalb die Wirkung niedermolekularer Extrakte aus verbrannter und unverbrannter Haut auf den Leberstoffwechsel untersucht.

Die Auswahl der untersuchten Stoffwechselreaktionen erfolgte auf Grund der Ergebnisse, die andere Arbeitsgruppen mit dem VT erhielten. Die Experimente Schölmerichs deuteten auf eine Störung des Energiestoffwechsels nach Verabreichung desBasler VT hin: An der perfundierten Rattenleber wurde ein gegenüber Kontrollgruppen erniedrigter ATP/ADP-Quotient gefunden, desgleichen waren die ATP-abhängigen Prozesse Gluconeogenese und Harnstoffsynthese erniedrigt. Elektronenmikroskopische Studien zeigten Veränderungen der Mitochondrienstruktur (Vakuolisation und Cristolyse) nach Applikation von VT, was ebenfalls auf eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels schließen läßt. Schönenberger stellte die Hypothese auf, daß als primärer Angriffsort eventuell die Zellmembran in Frage kommen könnte; auch hier dienten elektronenmikroskopische Beobachtungen zur Stützung dieser Hypothese: Isolierte Hepatocyten zeigten nach Inkubation mit dem VT zahlreiche Protrus ionen an ihrer Zelloberfläche (85). Ausgehend von diesen Befunden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ATP-abhängige Stoffwechselreaktionen bzw. allgemeine Vitalitätskriterien isolierter Hepatocyten nach Applikation mit VT bzw. mit Extrakten verbrannter und unverbrannter Haut untersucht. Außerdem wurden Versuche mit isolierten Lebermitochondrien unter

dem Einfluß der eben genannten Inkubationszusätze durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse werden im folgenden besprochen:

I) Untersuchungen an isolierten Hepatocyten

Ia) Einfluß der untersuchten Inkubationszusätze auf allgemeine Vitalitätskriterien der Leberzelle

Wie bereits erwähnt, soll das VT eventuell dadurch wirksam sein, daß es Störungen im Aufbau der Zellmembran bewirkt, sodaß die Zelle in ihrer Widerstandskraft, besonders gegenüber bakteriellen Infektionen, geschwächt wird. Die untersuchten Vitalitätskriterien setzen eine weitgehend intakte Membranstruktur voraus und sollten deshalb zur Überprüfung dieser Hypothese geeignet sein.

Im Trypanblautest waren i.a. 4-10% der Zellen anfärbbar, wobei auffälligerweise in erster Linie zweikernige Zellen davon betroffen waren. Die hier und in den weiteren Versuchen als Inkubationszusätze verwendeten Hautextrakte (Basler Verbrennungstoxin und seine native Vorstufe sowie die niedermolekularen Dialysate verbrannter und unverbrannter Haut) bewirkten im Test gegenüber der Kontrollgruppe keine Unterschiede. Deutlich erhöht ist der Anteil anfärbbarer Zellen hingegen, wenn man die Inkubation ohne genügende Sauerstoffversorgung durchführt.

Morphologische Untersuchungen mit dem Lichtmikroskop:

Leberzellen von mit VT vorbehandelten Tieren, noch stärker aber Hepatocyten unbehandelter Tiere, die direkt mit dem VT inkubiert wurden, zeigten laut (85) die Tendenz zur Ausbildung von Protrusionen. Eine Wiederholung dieser Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung nur mit Einschränkungen bestätigen: Zwar zeigten die mit VT inkubierten Hepatocyten in gewissem Ausmaß diese morphologischen Veränderungen, doch diese Befunde waren in quantitativer Hinsicht kaum von denen der Kontrollgruppen zu unterscheiden. Ganz anders aber lagen die Verhältnisse

nach Inkubation mit Phalloidin, das als positive Kontrolle diente: 80-95% der untersuchten Zellen zeigten die in der Literatur beschriebenen ausgeprägten Protrusionen; überraschenderweise war aber das Ausmaß der Anfärbbarkeit mit Trypanblau gegenüber Kontrollgruppen nicht erhöht.

Enzymaustritt aus den Zellen: Zellschädigungen geben sich u.a. durch einen vermehrten Austritt von Enzymen zu erkennen, was wegen ihrer leichten Bestimmbarkeit auch in der Diagnostik ausgenutzt wird. Nach den elektronenmikroskopischen Studien Kremers, der nach Applikation von VT ausgeprägte Schädigungen der Mitochondrienstruktur beobachtete (37), konnte erwartet werden, daß es zu einem vermehrten Austritt von GlDH und GOT, aber auch indirekt als Folge der Mitochondrienzerstörung von GPT und LDH kommt: Tatsächlich zeigten aber die verwendeten Hautextrakte gegenüber der Kontrollgruppe keinerlei Unterschiede. Lediglich bei ungenügender Sauerstoffversorgung während der Inkubation wurde ein stark erhöhter Enzymaustritt registriert.

Hormonsensibilität: Untersucht wurde die Ansprechbarkeit der Gluconeogenese unter dem Einfluß von Glucagon. Da die Integrität des Hormonrezeptors der Zellmembran Voraussetzung hiefür ist, stellt diese Reaktion ein empfindliches Kriterium für die Unversehrtheit der Membran dar. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß es unter dem Einfluß von Glucagon zu einer ausgeprägten Steigerung der Gluconeogenese kommt. Allerdings läßt sich diese verstärkte Syntheserate weder durch das VT noch durch die anderen mituntersuchten Hautextrakte beeinflussen, was eine Blockierung bzw. Störung der Rezeptorstruktur ausschließt. Trotzdem könnten natürlich die Rezeptorstrukturen anderer Hormone durch das VT in irgendeiner Weise beeinträchtigt sein: Dafür sollen - wenigstens bezüglich des Insulinrezeptors - nach (85) gewisse Hinweise vorhanden sein. Allerdings sprechen aus theoretischen Überlegungen einige Befunde gegen die Beeinflussung

eines speziellen Rezeptors durch das VT: Einerseits tritt das VT - entsprechend den Untersuchungen Schönenbergers - mit vielen Parenchymzellen in Wechselwirkung, wobei deren Ausstattung mit Hormonrezeptoren aber sehr unterschiedlich ist. Zum anderen ist die Oberflächenstruktur des Basler VT nicht einheitlich (man denke nur an die verschiedene Ausstattung der äußeren Lipidhülle bei menschlichen und bei Mäusetoxin sowie an die beschriebenen unterschiedlichen Lipidierungsmöglichkeiten des Apoproteinkerns). Das macht aber eine direkte Interaktion des VT mit dem Rezeptor, die ja in etwa nach dem allgemeinen "Schlüssel-Schloß Prinzip" ablaufen sollte, wenig wahrscheinlich. Allenfalls - basierend auf der aufgestellten Hypothese - könnte eine indirekte Wirkung des VT auf Rezeptoren dadurch möglich sein, daß durch unspezifische Inkorporation des VT in die Membran benachbarte Rezeptoren in ihrer sterischen Anordnung so gestört sind, daß eine Wechselwirkung mit den betreffenden Hormonen erschwert oder ganz verhindert wird. Allerdings gibt es keinerlei konkrete Hinweise für solch eine Störung.

Succinatstimulierbarkeit der Atmung als Vitalitätskriterium: Die Zugabe von Succinat zu isolierten Mitochondrien führt zu einer unmittelbaren Erhöhung der Atmungsgeschwindigkeit. Während Succinat also ungehindert die Mitochondrienmembran passieren kann, stellt die Plasmamembran der Leberzelle für eine 1-2 mmolare Succinatlösung eine Barriere dar. Somit läßt sich die Unversehrtheit der Plasmamembran am Ausmaß der Atmungsstimulierbarkeit nach Zugabe von Succinat überprüfen. Inkubierte Hepatocyten näherten sich im Verlaufe der Inkubation immer mehr dem optimalen Wert von 1,0, wobei keine Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den mit den üblichen Hautextrakten behandelten Zellen zu verzeichnen waren. Erhöhte Werte über einen längeren Zeitraum wurden aber gefunden, wenn den Zellen delipidiertes Apoprotein sowohl aus verbrannter als auch aus unver-

brannter Haut zugegeben wurde. Allerdings muß einschränkend gesagt werden, daß die beiden Apoproteinfraktionen vor ihrem Einsatz mit SDS behandelt wurden; obwohl sie vor der Inkubation mit den Hepatocyten ausgiebig dialysiert wurden, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, daß sie bei ihrem Einsatz vollständig SDS-frei waren. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß der registrierte Effekt auf SDS-Verunreinigungen zurückzuführen ist.

Ib) Einfluß der untersuchten Inkubationszusätze auf ATP-abhängige Stoffwechselwege der Leberzelle

Nach Verbrennungen kommt es zu tiefgreifenden Veränderungen im Energiehaushalt des Körpers. Laborchemisch beobachtet man eine ATP-Abnahme, gleichzeitig wird vermehrt anorganisches Phosphat in das Blut abgegeben. Therapeutisch wird versucht durch Gabe von ATP und Phosphat die Situation des Kranken zu verbessern, angeblich mit gutem Erfolg (133, 134). Die ungünstige energetische Situation ist auf verschiedene Ursachen zurückzuführen. So kommt es, wie bereits erwähnt, infolge des Sauerstoffmangels in den pripheren Geweben zu einer Reduzierung der Atmungskettenphosphorylierung, infolge der vermehrten Glykolyse wird die benötigte Energie verstärkt aus der weniger effektiven Substratkettenphosphorylierung bezogen. Die nach Verbrennungen lang anhaltende vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen führt zu einem Hypermetabolismus, wodurch die Energiereserven des Körpers schwer angegriffen werden. Zusätzlich belastend auf den Energiehaushalt wirken sich die häufig auftretenden Infektionen aus. Dem Körper wird so viel Energie entzogen, daß energieverbrauchende, anabole Reaktionen (z.B. die Synthese der dringend benötigten Immunglobuline) nicht mehr in genügendem Maße durchgeführt werden können. So wird die Frage diskutiert, ob die letztendliche Todesursache nach schweren Verbrennungen in einem allmählichen Verbrauch der Energiereserven des Körpers zu suchen ist (135). Ganz besonders ungünstige Verhält-

nisse bezüglich des Energiestatus des Körpers ergeben sich dadurch, daß nach ausgedehnten Verbrennungen weite Teile der Haut als Barriere gegen die Wasserverdunstung verlorengehen. Ein Großteil der bereits in reduzierter Menge zur Verfügung stehenden Energie muß nun dafür verwendet werden, um die Verdunstungskälte zu kompensieren und die Wärmeneutralität aufrechtzuerhalten (136-138). Die dazu benötigte Wärme wird zum größten Teil in den Mitochondrien im Rahmen der Atmungskettenphosphorylierung erzeugt, wobei unter Normalbedingungen etwa 30% der zur Verfügung stehenden Energie unter Bildung von ATP konserviert werden. Unter diesen Bedingungen spricht man von gut gekoppelten Mitochondrien. Eine teilweise Entkopplung, eventuell als Resultat einer vermehrten Katecholaminausschüttung, könnte nun ein durchaus wünschenswertes Regulationsphänomen infolge des vermehrten Wärmebedarfs nach schweren Verbrennungen darstellen. Kälteanpassungen nach diesem Mechanismus sind in der Literatur beschrieben (139, 140). Allerdings findet Zawacki bei seinen Untersuchungen, daß der Körper mehr Hitzeenergie abgibt, als er es zum Erreichen seiner Wärmeneutralität nötig hätte (141). Aus diesen und anderen Beobachtungen stellt sich nun die Frage, ob Veränderungen der Mitochondrien per se (eventuell durch Einwirkung eines Verbrennungstoxins, wie es nach den elektronenmikroskopischen Aufnahmen Kremers nicht unwahrscheinlich wäre) eine ursächliche Wirkung im gestörten Energiestoffwechsel der Zelle haben. Unterstützt werden diese Vermutungen durch Untersuchungen, bei denen gezeigt werden konnte, daß isolierte Mitochondrien drei Tage nach dem Verbrennungstrauma eine Reduzierung des ACR auf 71% gegenüber Kontrollgruppen zeigten (117). Schließlich sollte noch erwähnt werden, daß es im Endotoxinschock zu einer Hemmung der Adeninnucleotidtranslocase kommt (131). Da dieses Enzym die Aufgabe hat, cytoplasmatisches ADP gegen das in den Mitochondrien gebildete ATP auszutauschen, kann es

auch hier zu Störungen im Energiehaushalt kommen. Insgesammt muß man also bei Verbrennungen mit einer Vielzahl an Beeinträchtigungen bezüglich der energetischen Verhältnisse rechnen, wobei das Ausmaß der einzelnen Hemmungen wohl von der Natur und Stärke des jeweiligen Verbrennungstraumas abhängen wird.
Bevor nun auf die Ergebnisse der Untersuchungen an isolierten Mitochondrien eingegangen wird, seien im folgenden die überprüften ATP-abhängigen Reaktionen an isolierten Hepatocyten wiedergegeben.
Gluconeogenese: Die nach Verbrennungen stark erhöhten Katecholaminspiegel führen primär zu einem schnellen Blutglucoseanstieg, in weiterer Folge kommt es aber dann zu einer Hypoglycämie:(142,143). Die vermehrte Ausschüttung der Katecholamine führt in den peripheren Geweben infolge Vasokonstriktion zu einer ungenügenden Versorgung mit Sauerstoff. Diese anaerobe Stoffwechsellage führt dazu, daß die Zellen ihren Energiebedarf vermehrt über die Glykolyse decken müssen.
Die in dieser Arbeit direkt mit VT oder anderen Hautextrakten inkubierten Hepatocyten zeigten keine Veränderungen in der Syntheserate gegenüber Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Resultaten Schölmerichs, der bei Direktinkubationen ebenfalls keine Veränderungen feststellen konnte (85). Er fand allerdings bei mit VT vorbehandelten Tieren während der Leberperfusion eine reduzierte Gluconeogenese (148). In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß in der Literatur nach Endotoxinapplikation ebenfalls reduzierte Gluconeogeneseraten gefunden wurden (88); eine Verunreinigung des VT mit Endotoxin ist aufgrund der nicht sterilen Aufarbeitungsbedingungen nicht auszuschließen.
Harnstoffsynthese: Infolge der nach Verbrennungen katabolen Stoffwechsellage des Organismus ist eine negative Stickstoffbilanz und als Ausdruck dafür u.a. eine verstärkte Harnstoffausscheidung zu erwarten.
Bezüglich der Befunde der Harnstoffsynthese nach Appli-

kation von VT sind die Resultate ziemlich uneinheitlich und widersprüchlich. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigten sich bei direkter Inkubation mit VT keine veränderten Syntheseleistungen gegenüber Kontrollgruppen. Auch dieser Befund steht im Einklang mit den Resultaten Schölmerichs. Bei Leberperfusionen wurden von ihm aber, ebenso wie im Falle der Gluconeogenese, eine reduzierte Harnstoffsynthese beobachtet (148). Dieses Ergebnis steht aber in Widerspruch zu den Befunden Schönenbergers, der nach Applikation des VT bei Mäusen mit blockiertem RES nach 24 Stunden eine 3-4 fach erhöhte Harnstoffausscheidung findet (43). Allerdings würde man aber auch nach Befunden, daß es nach VT-Applikation zu einer vermehrten Proteolyse (vermehrte Abgabe von Aminosäuren ins Medium (85)) kommt, eine erhöhte Harnstoffsynthese erwarten.

Proteinbiosynthese: Nach Verbrennungen kommt es zu schweren Störungen im Proteinhaushalt. Laborchemisch auffällig ist naturgemäß der Serumproteinmangel, der vielfältigste Ursachen hat: Teilweise treten Verluste durch eine hitze- oder schockbedingte Zunahme der Gefäßpermeabilität auf, teilweise kommt es zu einer Proteinurie durch schockbedingte Epithelschäden. Ebenso sind Aktivitäten proteolytischer Enzyme zu verzeichnen. Darüberhinaus ist auch die Frage nach der Proteinneusynthese von Bedeutung. So wird z.B. von einer gesteigerten Synthese der Akut-Phasen-Proteine als Antwort auf den Gewebszerfall berichtet (144). Insgesamt überwiegen aber hemmende Faktoren. Verantwortlich dafür wird der vermehrte Energiebedarf (Neutralisierung der Verdunstungskälte bzw. die erhöhte Ausscheidung der Katecholamine) gemacht. Wahrscheinlich dürfte aber auch die Ausscheidung von Exotoxinen bei der häufig nach Verbrennungen auftretenden Pseudomonasinfektion eine nicht unbedeutende Rolle spielen: Auf die außerordentliche Toxizität dieser Exotoxine wurde bereits hingewiesen. Das VT hatte bei

direkter Inkubation mit Hepatocyten keinen Einfluß auf die Syntheseleistungen. Der Zusatz von Cycloheximid, einem spezifischen Hemmstoff der eukaryontischen Proteinsynthese (145) führte zu der erwarteten starken Hemmung (positiver Kontrollversuch).

RNA-Synthese: Das Ausmaß der RNA-Synthese stellt einen empfindlichen Parameter bezüglich der Zellvitalität dar, da ihr Aufbau aus der angebotenen Vorstufe Uridin das Zusammenwirken verschiedener Zellorganellen (Kern, Mitochondrien, Cytoplasma und Zellmembran) zur Voraussetzung hat. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß sowohl ein ungenügendes Sauerstoffangebot als auch die Mitführung von α-Amanitin (eukaryontischer Polymerasehemmer (146)) einen stark hemmenden Einfluß auf die Synthese ausübt. VT hingegen war wirkungslos.

Eine beträchtliche Hemmung der Syntheseleistung konnte aber durch Inkubation mit niedermolekularen Extrakten verbrannter und unverbrannter Haut erzielt werden. Zwar wurde bislang noch keine gründliche Analytik dieser Dialysate durchgeführt, doch aus den erhaltenen Resultaten kann man schließen, daß es sich dabei um eine (oder mehrere Substanzen) handeln muß, die durch die Verbrennung freigesetzt wird und nicht erst unter dem Einfluß thermischer Energie entsteht. Die Aktivität dieser Substanz kann durch kurzes Erhitzen auf 150-200°C erheblich reduziert werden. Neben anderen Metaboliten kam vor allem Galaktosamin in Verdacht, der hemmende Bestandteil dieser Dialysate zu sein. Deshalb wurde in einem Parallelansatz der Einfluß von Galaktosamin, dessen Einfluß auf die RNA-Synthese aus der Literatur bekannt ist (103), untersucht. Dabei ergab sich aber, daß für einen hemmenden Effekt im gleichen Ausmaß wie bei Verwendung der Dialysate beobachtet, eine Galaktosaminkonzentration nötig wäre, wie sie im Dialysat mit Sicherheit nicht vorliegt. Somit scheidet also Galaktosamin als Hauptursache aus, obwohl die mit großer Wahrscheinlichkeit im Dialysat vorhandenen Galaktosaminanteile auch ihren Beitrag

zur Hemmung leisten könnten. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß die Toxizität des Galaktosamins bei gleichzeitiger Applikation von Endotoxin ganz erheblich verstärkt wird (88). Auch an dieser Stelle muß wieder darauf hingewiesen werden, daß eine Kontamination des Dialysats mit Endotoxin nicht ausgeschlossen werden kann. Auf alle Fälle dürfte aber die Kombination Galaktosamin/Endotoxin bei in vivo Verbrennungen eine Rolle spielen.

II) Untersuchungen an isolierten Mitochondrien

Die Wirkung verschiedener Hautextrakte auf die Mitochondrienatmung wurde teilweise nach Direktinkubation untersucht, teilweise wurden Ratten mit den entsprechenden Extrakten vorbehandelt und ihre Mitochondrien 4 Tage später isoliert. Die bei Direktinkubationen erhaltenen Befunde zeigen, daß mit Ausnahme des trockenen Destillates alle anderen Inkubationszusätze keinen Einfluß auf die ermittelten Atmungsparameter (endogene Atmung, Status 3 und Status 4 Atmung bzw. auf den Atmungskontrollquotienten) ausübten. Auch das Verbrennungstoxin war ohne Wirkung.
Beträchtliche Störungen der Atmungsfunktion verursachten hingegen die beiden isolierten Fraktionen der trockenen Destillation: Fraktion 1, die vorwiegend Wasser und zu einem geringen Teil niedrigsiedende Komponenten enthält (bis ca. 150°C), zeigte dabei folgendes Verhalten: Bei Zugabe zu den im Basismedium inkubierten Mitochondrien kommt es zu einer vorübergehenden leichten Atmungsstimulierung. Addition von Succinat bzw. α-Ketoglutarat (Überführung in status 4-Atmung) bewirkt nun eine gegenüber den Kontrollgruppen erhöhte Atmungsgeschwindigkeit. Zugabe von ADP (Überführung in Status 3-Atmung) zeigt keine Wirkung auf die Atmungsrate, die Fraktion hat also offensichtlich eine stark entkoppelnde Wirkung. Zugabe von Fraktion 2 (wasserarmes, hochsiedendes Kondensat (150-270°C)) zu den im Basismedium atmenden Mitochondrien verändert

deren Atmungsrate nicht. Anschließende Zugabe von Succinat (α-Ketoglutarat) und ADP beeinflussen das Atmungsgeschehen ebenfalls nicht: die ursprüngliche Atmungsrate bleibt noch einige Minuten aufrecht erhalten, schließlich versiegt die Atmung allmählich.
Die Mitochondrien vorbehandelter Tiere zeigten gegenüber Kontrollgruppen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich nach Applikation von Endotoxin war eine leichte Reduzierung des ACR-Wertes festzustellen.
Etwas überraschend - nach den sehr eindeutigen Ergebnissen der Direktinkubation - findet man nach Injektion der Destillatfraktionen keine Veränderungen der untersuchten Mitochondrienparameter. Möglicherweise mag das an einer zu geringen Dosierung gelegen haben, eventuell aber auch daran, daß gerade die am schwersten beschädigten Mitochondrien den Aufarbeitungsgang nicht überlebt haben: Die Untersuchungen wären dann also an den übriggebliebenen, intakten Mitochondrien durchgeführt worden; dieser Sachverhalt stellt ein Problem dar, mit dem man immer bei derartig konzepierten in vitro-Versuchen zu rechnen hat.
Das Verbrennungstoxin war auch in dieser Versuchsreihe wirkungslos. Gerade mittels der Mitochondrienversuche war aber am ehesten zu erwarten, eine Bestätigung für die Hypothese eines ATP-Mangels nach Einwirkung von VT zu erhalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Stoffwechseluntersuchungen lieferten also in keinem Fall Hinweise darauf, daß das nach der Vorschrift Schönenbergers isolierte VT cytotoxische Eigenschaften aufweist. Nun können in vitro-Versuche dieser Art zwar nicht unbedingt als Ausschlußkriterium herangezogen werden, da sie stets nur einen kleinen Bereich der in vivo tatsächlich ablaufenden Prozesse widerspiegeln. Insofern ist es vorstellbar, daß die von anderen Arbeitsgruppen erhobenen Befunde nach Leberperfusionen (reduzierter ATP/ADP-Quotient, verringerte Harnstoff- und Gluconeo-

genese, Vacuolisation und Cristolyse der Mitochondrien) sich nicht unbedingt bei Verwendung isolierter Hepatocyten als Testsystem bemerkbar machen müßten. Besonders gut ist diese Problematik am Beispiel der Phalloidinintoxikation untersucht, bei der man feststellen konnte, daß isolierte Hepatocyten im Vergleich zu der den in vivo-Verhältnissen näher kommenden Perfusion weitaus schlechter als Testsystem geeignet sind (86).
Trotz dieser Einschränkungen verbleiben nach Durchführung der Versuche dieser Arbeit Zweifel am Konzept des VT. Diese Zweifel werden noch dadurch verstärkt, daß einige der beschriebenen Methoden einfach nicht reproduziert werden konnten. So gelang es z.B. nie im Sucrosegradienten die beiden Banden (VT und dessen native Vorstufe) nach der Acetonfällung zu isolieren. Besondere Einwände ergeben sich dadurch, daß im Letalitätstest die in der Literatur beschriebenen Verhältnisse ebenfalls nie erreicht wurden. Die Injektion einer 3-4fach höheren Dosis als es nach der Originalvorschrift eigentlich erforderlich wäre, führte zwar gelegentlich zum Tod der Tiere, aber die Abgrenzung dieser Resultate gegenüber Versuchen mit der unverbrannten Vorstufe war keineswegs so eindeutig: auch hier wurden gelegentlich letale Folgen beobachtet. Eine einzige Versuchsserie von vielen zeigte ein eindeutiges Resultat: Nach Applikation von je 100 mg VT/200 g Ratte starben alle 4 Tiere innerhalb von 4 Tagen. Hinzugefügt werden sollte, daß die dabei verwendete VT-Charge 15 Monate bei -20°C aufbewahrt wurde. Da die Aufarbeitung nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde, muß eine Kontamination mit Endotoxin in Erwägung gezogen werden. Roth, aus der Arbeitsgruppe unseres Labors, wies mit Hilfe des Limmulus-Lysat-Tests (149) nach, daß das aufgearbeitete VT immer Endotoxinaktivität besaß.
Es stellt sich nun die Frage, warum es unter Einhaltung der von Schönenberger angegebenen Bedingungen nicht gelingt, den Letalitätstest nachzuvollziehen,

zumal die Isolierung des VT vom technischen Standpunkt aus gesehen keine Schwierigkeiten bereitet. Schönenberger macht in erster Linie 2 Faktoren dafür verantwortlich (persönliche Mitteilung): Ein nicht genaues Einhalten der Verbrennungsbedingungen (250°C/ 15-20 Sekunden) und der Homogenisierungsdauer. Diese Störfaktoren können aber bei unserer Aufarbeitungsmethode ausgeschlossen werden: Wir verwendeten das gleiche Homogenisierungsgerät und einen auf 250°C thermostatisierbaren Metallstempel.

Obwohl das Gesamtkonzept dieses VT auf den ersten Blick geschlossen erscheint und schließlich seinen krönenden Abschluß angeblich in der Isolierung und erfolgreichen Anwendung eines spezifischen Antitoxins fand, gibt es doch bei näherer Untersuchung auch der Literaturdaten einige unbefriedigend erklärte Punkte, auf die im folgenden eingegangen sei:

Die Letaldosis beträgt bei blockiertem RES 0,3 mg VT/g (Maus). Wenn man diese Werte überschlagsmäßig auf einen erwachsenen Menschen überträgt, so sind etwa 10-50 GRAMM VT erforderlich, um die Letaldosis zu erreichen. Ob es bei solchen Mengen überhaupt sinnvoll ist, von einem Toxin zu sprechen - manchmal sogar von dem Verbrennungstoxin - sei dahingestellt. Noch ungünstiger liegen die Verhältnisse, wenn man in Rechnung stellt, wie häufig und in welchem Ausmaß in vivo Verbrennungen ablaufen, die die Bedingungen einer optimalen Toxinproduktion (250°C/20 Sekunden oder aliquote Verhältnisse) überhaupt erfüllen. Man könnte nun einwenden, daß in Zusammenhang mit den vielen anderen Stoffwechselstörungen eine weitaus geringere Dosis an VT ausreichend sei, um Letalität zu erzeugen. Dieser Aussage wird aber durch folgendes Experiment widersprochen, das dem VT eine zentrale Rolle bei der Verbrennungskrankheit zuweisen würde: Mäuse, denen 18% ihrer Körperoberfläche verbrannt wurde (250°C/15 Sekunden) starben nach 8 Tagen zu 90-100%. Dabei wurde 0.7mg VT/g Maus gebildet. Die im Vergleich zu einer ip-Injektion erhöht benötigte VT-Menge um 100% Letalität zu erzeugen erklärt Schönenberger mit den

unterschiedlichen Resorptionsverhältnissen. Bei 9% Verbrennung (0,4mgVT/g Maus) überlebten 70% der Tiere. Diese Daten entsprechen nicht den Verhältnissen, die man eigentlich erwarten konnte:Trotz eventuell erschwerter Resorption nach in vivo Verbrennungen sollte eigentlich eine geringere VT-Menge als bei ip-Applikation ausreichend sein, um gleiche Letalität herbeizuführen: Während nach ip-Injektion das Versuchstier sich lediglich mit der eventuellen Toxizität des VT auseinandersetzen muß, treten bei in vivo Verbrennungen zusätzlich eine Reihe verbrennungsspezifischer Komplikationen auf. Nach den Ergebnissen des Versuches müßten diese aber im Vergleich zum Effekt des VT eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Schwer zu interpretieren ist auch folgender Befund: Nach Blockierung des RES mit Thorotrast überlebten sämtliche Mäuse eines Kollektivs eine ip-Injektion von o,25mg VT/g Maus. Erhöht man diese Dosis auf nur 0,30 mg VT/g Maus, so sterben sämtliche Tiere innerhalb von 48 Stunden: Diese Ergebnisse lassen nicht einmal einen Freiraum für biologische Schwankungen erkennen.

Nicht ganz unproblematisch ist auch das vorgeschlegene Modell der VT-Entstehung aus seiner nativen Vorstufe. An Hand elektronenmikroskopischer Bilder und analytischer Daten wurden Modelle entwickelt, die davon ausgehen, daß sowohl das VT als auch seine native Vorstufe jeweils aus 6 verschiedenen Proteinen (=Apoproteinanteil) und einer umhüllenden Lipidschicht (aufgebaut aus 6 verschiedenen Lipidklassen) aufgebaut sind. Laggner weist allerdings darauf hin, daß ein aus mehreren Proteinen aufgebauter Apoproteinanteil bei Lipoproteinen eher ungewöhnlich ist (147).

Wie hat man sich die Toxinformation vorzustellen? Offensichtlich kommt es gemäß den Modellvorstellungen durch die Einwirkung thermischer Energie zu einem wenigstens teilweisen "Abschmelzen" der Lipidhülle.

Dadurch können die Apoproteinkerne von genau 3 nativen Vorstufen miteinander in Kontakt treten unter Ausbildung wahrscheinlich nichtkovalenter Bindungen. Schließlich umgibt die Lipidhülle der 3 nativen Vorstufen den nun verdreifachten Apoproteinkern.
Dieses Modell wirft einige Fragen auf: Wie ist es zu erklären, daß dieser auf recht unspezifische Weise ausgelöste Polymerisationsvorgang gerade auf der Stufe der Trimerisierung Halt macht? Warum treten keine di-tetra-oligomeren Formen auf - was vor allem auch deshalb zu erwarten wäre, da die Wechselwirkung der Reaktionspartner als nichtkovalent anzunehmen ist:: Dafür spricht die Beobachtung Schönenbergers, daß das VT, 24 Stunden bei Zimmertemperatur in wässriger Lösung aufbewahrt, wieder in seine monomere Vorstufe zerfällt. Wie allerdings unter diesen Umständen die Isolierung des VT überhaupt gelingen kann, ist rätselhaft: Dauert doch die Reinigung aus dem Rohextrakt, bedingt durch mehrere nötige Dialyseschritte, bereits einige Tage.
Weiters kann das vorgeschlagene VT-Modell nur schwer die Anordnung und Funktion der Lipide erklären: Ausgehend von der Behauptung, daß die native und trimerisierte Form über völlig verschiedene antigene Eigenschaften verfügen soll, ist eine rein zufällige Anordnung der Lipide um den Apoproteinkern wohl auszuschließen, zumal nach ESR-Untersuchungen die Lipidhülle an ganz bestimmten Stellen Lücken für den Zugang des Apoproteinanteils zum umgebenden wässrigen Medium zulassen soll. Umso erstaunlicher ist es, daß nach einer Delipidierung eine Wiedervereinigung des Apoproteinanteils mit dem Lipidanteil in der vollkommenen Form möglich sein soll, daß das VT seine vollständige Aktivität (Letalitätstest) wiedererlangt. Noch erstaunlicher ist die Schilderung, daß ein käufliches Gemisch der 6 Lipidklassen der äußeren Hülle durch einfaches Rühren bei 60°C mit dem Apoprotein ein voll funktionsfähiges Verbrennungstoxin ergeben soll! Diese Befunde

würden eher auf eine rein zufällige Umhüllung des Apoproteins hinweisen. Allerdings ist eine Rekombination nach einem so einfachen Mechanismus nur sehr schwer vorstellbar. Schließlich sind grundsätzliche Zweifel angebracht, ob es mit so allgemeinen Aufarbeitungsmethoden - wie es eine Ammoniumsulfat- und Acetonfällung darstellen - wirklich gelingt, aus verbrannten und unverbrannten Hautproben Reinprodukte darzustellen. Im Falle der Isolierung des VT aus dem Serum Verbrannter soll ja die Aufarbeitung noch einfacher gelingen! Konsequenterweise sind deshalb auch die analytischen Daten, die die Grundlage des vorgeschlagenen VT-Modells darstellen, mit größter Vorsicht zu beurteilen. Was die Ähnlichkeit der Analysenwerte zwischen dem Verbrennungstoxin und seiner nativen Vorstufe betrifft, so sollte man nicht übersehen, daß man mit so allgemeinen Aufarbeitungsmethoden wahrscheinlich immer zu ähnlichen Zusammensetzungen bei Produkten verbrannter und unverbrannter Haut kommen wird, unabhängig davon, ob zwischen ihnen ein funktioneller Zusammenhang besteht oder nicht.
Abschließend kann gesagt werden, daß das Konzept dieses Verbrennungstoxins doch erhebliche Mängel aufweist und keineswegs so eindeutig abgesichert ist, wie es nach einer ersten Literaturübersicht erscheinen mag. Ein Teil der gefundenen biologischen Wirkungen des VT könnte eventuell auf Endotoxinkontaminationen zurückzuführen sein, für einen anderen Teil mag vielleicht gelten, was der Physiologe Johannes Müller bereits 1824 bei seiner Bonner Antrittsvorlesung ausführte: "Es ist nichts leichter, als eine Menge sogenannter interessanter Versuche zu machen. Man darf die Natur nur auf irgendeine Weise gewalttätig versuchen, sie wird immer in ihrer Not eine leidende Antwort geben."

Während also für die Existenz eines Verbrennungstoxins, wie es von der Basler Arbeitsgruppe um Schönenberger postuliert wird, im Rahmen dieser Arbeit keine

Hinweise erhalten wurden, wurden im Verlaufe der Stoffwechseluntersuchungen zwei verschiedene Extrakte aus verbrannter und unverbrannter Haut mit cytotoxischen Eigenschaften gefunden: Dialysate aus verbrannter und unverbrannter Haut zeigten einen hemmenden Einfluß auf die RNA-Synthese, während das trockene Destillat von Mäusehaut Störungen der Atmung bei isolierten Mitochondrien hervorrief. Somit werden den inzwischen zahlreichen "Verbrennungstoxinen" weitere hinzugefügt. In welchem Maße sie bei "durchschnittlichen" Verbrennungen auftreten und welche Bedeutung ihnen in vivo zukommt, kann noch nicht gesagt werden. Auf alle Fälle machen die durchgeführten Versuche deutlich, daß zusätzlich zu den "Standartstoffwechselstörungen" nach Verbrennungen noch mit einer Reihe weiterer Komplikationen durch Einschleußung körpereigener Gifte gerechnet werden kann. Art und Ausmaß der gebildeten Toxine sind wohl jeweils vom Charakter der vorliegenden Verbrennung abhängig. Ungerechtfertigt erscheint aber die Hypothese, daß der Verbrennungskrankheit ein eigenes, spezielles Verbrennungstoxin zugeordnet werden könnte; sie mag wohl ihren Ursprung im Wunsche nach einer optimalen Therapiemöglichkeit haben.

4. MATERIALIEN

Ratten wurden von der Tierzuchtanstalt Ivanovas, Kisslegg, bezogen (250-350 g, Männchen und Weibchen, Rasse: Sprague-Dawley).
Als Hautlieferanten dienten weibliche NMRI-Mäuse, bezogen von der Tierfarm Sulzfeld.
Collagenase (E.C.3.4.4.19), Antimycin, CCP, Cycloheximid, α-Amanitin, Phalloidin wurden von Boehringer, Mannheim bezogen, ebenso wie die Testkombinationen für ATP, ADP/AMP, LDH, GOT, GPT, GlDH, Harnstoff und Glucose. Galaktosamin, Glucosamin, Glutaraldehyd, OsO_4 sowie die gebräuchlichen Laborchemikalien stammen von Merck, Darmstadt. Trypanblau und Glucagon wurde von Serva, Heidelberg erhalten, Endotoxin (LPS von E.coli 026:B6) von Difco Lab. Detroit, Michigan. Penicillin/Streptomycinlösung (10 ooo E bzw. 1o ooo µg/ml) Serva, Heidelberg. Nembutal^{R} (Na-pentobarital), 60 mg/ml: Abbott S.A., Belgien; Heparin-Natrium (5000 IE/ml): medac, Hamburg.

Alle radioaktiven Substanzen wurden von der Firma Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen:
(U-^{14}C) Uridin, 450-540 mCi/mmol
L (U-^{14}C) Valin, 250 mCi/mmol
(U-^{14}C)-Algenproteinhydrolysat, 50 mCi/m atom C

Toluolscintillator: 5g PPO + 0,1g POPOP, gelöst in 1 Liter Toluol.

5. METHODEN

5.1. Isolierung des Verbrennungstoxins und seiner nativen Vorstufe

Weibliche NMRI-Mäuse, 20-25 g, wurden durch Genickbruch getötet. Nach der Rasur der Fellhaare und Abschabung der subcutanen Fettschicht wurden die Mäusehäute

auf einer Aluminiumfolie ausgebreitet und mit einem Verbrennungsstempel 15-20 Sekunden bei 250°C verbrannt. Anschließend wurden die Hautstücke in flüssiger Luft eingefroren; in diesem Zustand ließen sie sich gut mörsern. Die von Schönenberger angegebene Methode, die Hautstücke nach dem Auftauen mit der Schere so klein wie möglich zu zerschneiden, ist nicht so wirkungsvoll, außerdem ist die Gefahr einer bakteriellen Kontamination dabei recht groß. Die fein gemörserte Haut wurde schließlich in Sucrosephosphatlösung aufgenommen (0,25 M Sucrose; 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,6). Entsprechend der Originalvorschrift wurde 1 g verbrannte Haut in 100 ml Puffer, 1 g unverbrannte Haut in 50 ml Puffer suspendiert. Die Suspension wurde mit einem Messerhomogenisator (Fa.Bühler, Tübingen) 15 Minuten bei 40000 rpm unter Wasserkühlung homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde bei 4°C und 3000 g 20 Minuten zentrifugiert. Neben einem Sediment resultierte eine überstehende, zusammenhängende Fettschicht. Die sich dazwischen ausbildende milchige Phase wurde gegen Tyrode (deprotonisierte Serumelektrolytlösung) dialysiert. Das VT wurde durch schrittweise Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu 30% Sättigung, die native Vorstufe bis zu 20% Sättigung ausgefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und zuerst gegen Wasser, dann gegen Tyrode so lange dialysiert, bis kein Ammoniumsulfat mehr nachweisbar war (Nessler-Reagenz). Anschließend wurde das VT bzw. seine native Vorstufe durch Zugabe von Aceton (-30°C) bis zu einem Verhältnis von 50% ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation gewonnen und gegen Aqua bidest. dialysiert. Zum Schluß wurde das erhaltene Produkt lyophilisiert.

In der Originalvorschrift schließt sich an diesen Schritt noch eine Sucrosedichtegradientenzentrifugation an, als deren Ergebnis eine Auftrennung des Lyophilisats in das VT und in die nach Verbrennung noch vorhandenen Anteile der nicht umgesetzten Vorstufe

(ca 30-50%) stattfinden soll. Es war aber nicht möglich diesen Schritt zu reproduzieren (44). Aus diesem Grunde wurde das Lyophilisat als "Verbrennungstoxin" eingesetzt. Gelegentlich wurde auch das delipidierte VT bzw. die delipidierte native Vorstufe für Untersuchungen verwendet. Die Herstellung erfolgt durch eine Delipidierung nach Folch (48) und ist in (44) genau beschrieben.

5.2. Isolierung der niedermolekularen Dialysate aus verbrannter und unverbrannter Haut

Die Aufarbeitung erfolgte bis zur Gewinnung der milchigtrüben Mittelschicht so wie in Abschnitt 5.1. beschrieben. Der einzige Unterschied besteht darin, daß das zu homogenisierende Hautgewebe nicht in Sucrosephosphatpuffer, sondern in Aqua bidest. suspendiert wurde. Dialysiert wurde ebenfalls gegen Aqua bidest. Extrakte von 55 verbrannten Mäusehäuten (=Dialysat verbrannt, I) bzw. von je 22 verbrannten und unverbrannten Mäusehäuten (=Dialysat verbrannt bzw. unverbrannt, II) wurden gegen 3 Liter Aqua bidest., dem je 1 ml Antibiotikalösung (Penicillin/Streptomycin) pro Liter zugefügt wurde, dialysiert. Nach 48 Stunden wurden diese 3 Liter am Rotationsverdampfer bei 40°C bis auf 60 ml eingeengt und bis zur Verwendung in 1 ml Portionen eingefroren.

5.3. Gewinnung des (trockenen) Destillats

Die trockene Destillation wurde in einem Quarzrohr, das von einem Heizmantel umgeben ist, durchgeführt. Durch diesen Heizmantel ist es möglich, Temperaturen zwischen 20-1000°C zu erzeugen. 2 Quarzschiffchen, in denen 18 Mäusehäute ausgelegt waren, wurden in das Heizrohr gestellt und die Temperatur wurde kontinuierlich von 20 auf 270°C erhöht. Die flüchtigen Gase wurden mittels eines leichten Luftstromes aus dem Verbrennungsrohr in die gekühlten Vorlagegefäße übergeführt. Bei Temperaturen um 100°C tritt ein kräftiger

Wasserdampfstrom vorwiegend in das erste Röhrchen über, wo er sofort erstarrt (Kühlung mit flüssiger Luft). Allmählich erscheinen zuerst leicht gelbliche, später licht- bis dunkelbraune Fraktionen, die immer stärker erst im zweiten Röhrchen kondensieren. Bei 270°C wurde die Destillation abgebrochen. Die Destillate wurden gut verschlossen bei -20°C verwahrt.

5.4. Isolierung der Hepatocyten

Die Ratte wird durch i.p. Injektion mit Nembutal^{R} (0,5-0,9 ml/Ratte) narkotisiert. Nach Freilegung der vena femoralis wird in diese 150 µl Heparin injiziert. Anschließend wird die Bauchdecke geöffnet und um die cava inferior oberhalb des rechten Nierenabganges eine lose Schlinge gelegt, ebenso um die vena portae. Das Operationsmedium (Calcium-freie Hanks-Lösung, 22,5 mmolar an $NaHCO_3$ + 1g Glucose/Liter, pH 7,2 - 7,4) befindet sich in einem Wasserbad (40°C) und wird fortwährend mit Carbogen begast. Die Pumpe, der eine Luftblasenfalle nachgeschaltet ist, wird auf eine Laufgeschwindigkeit von 3,5 - 4 ml/g Lebergewicht/min. eingestellt. Bei laufender Pumpe wird nun, nach Kanülierung der Pfortader mittels einer Braunüle 1 (Braun, Melsungen) die Verbindung mit der Leber hergestellt. Gleichzeitig wird die cava unterhalb des Nierenabganges durchgeschnitten, wodurch die Leber praktisch augenblicklich entblutet wird. Nach Öffnung des Brustraumes wird in die obere Hohlvene eine Braunüle 1 eingeführt und gut verknotet. Schließlich wird die Schlinge oberhalb des Nierenausganges geschlossen, sodaß das Medium nun aus der kanülierten cava austritt. Zum Schluß wird der Mediumfluß umgekehrt: Die Verbindung zur Pfortader wird entfernt, stattdessen wird eine Verbindung zur cava hergestellt. Die Braunüle wird aus der Pfortader herausgezogen und die Leber wird nun aus der Ratte herauspräpariert. Da die nichtrezirkulierende Vorperfusion 10-12 Minuten nicht unterschreiten sollte, hat man dazu genügend Zeit.

Die herauspräparierte Leber wird auf eine Siebplatte gelegt und in das rezirkulierende Perfusionssystem, das sich bei 37°C Lufttemperatur in einer feuchten Kammer befindet, gebracht. Den 100 ml Perfusionsmedium (gleiches Medium wie zur Vorperfusion), das laufend begast wird, werden 40 mg Collagenase zugefügt, bei manchen Präparationen auch $CaCl_2$ (2 mmolar). Nach 15-25 Minuten wird die Leber weich und beginnt zu "zerfließen"; sie wird aus dem System geholt und im Perfusionsmedium in einer Petrischale unter Begasung mit Carbogen weiterbehandelt: Die die Leber noch zusammenhaltende capsula fibrosa wird mit 2 feinen Pinzetten teilweise abgezogen und die Leberzellen werden daraus ausgebeutelt. Die Suspension wird schließlich in einen Rundkolben übergeführt und am Rotationsverdampfer unter Carbogenbegasung 5 Minuten weiterbehandelt. Anschließend wird die Zellsuspension über ein Nylonnetz (Maschenweite 150 µ, Filtertechnik B+S Seebach, Vellmar) filtriert. Nach Zentrifugation bei 50 g (30 Sekunden) wird das Zellpellet 3 mal mit Calciumhaltigem Medium gewaschen. Die Zellen werden danach mikroskopisch ausgezählt und - nach entsprechender Verdünnung - zur Inkubation eingesetzt.

5.5. Trypanblautest

200 µl Zellsuspension wurden unmittelbar nach der Isolierung mit 200 µl Trypanblaulösung (0,5%) gemischt. Der Anteil blau anfärbbarer Zellen wird mikroskopisch (Neubauer Zählkammer) ermittelt; 200-300 Zellen wurden i.a. ausgezählt.

5.6. Vorbereitung der Zellen für die Elektronenmikroskopie

5 ml Zellsuspension (ca $30x10^6$ Zellen) wurden nach 60 minütiger Inkubation mit dem gleichen Volumen Glutaraldehyd (4 %ige Lösung) versetzt und 90 Minuten bei Zimmertemperatur aufbewahrt (16 ml 25% Glutaraldehyd reinst, Merck + 84 ml 0,05% Cacadylatpuffer, pH 7,4).

Dann wurde der überstehende Glutaraldehyd von den sich absetzenden Zellen abgesaugt. Diese wurden 2x mit 0,25 M Sucroselösung gewaschen. Die Zellsuspension wurde daraufhin in "small specimen chambers" (Reichert, Wien) übergeführt und nochmals mit Sucroselösung gewaschen. Die Kammern wurden dann für 60 Minuten in 1% OsO_4-Lösung gelegt. (0,2 g OsO_4 in 10ml 0,2 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4 + 10ml Aqua bidest.) Anschließend wurden die Zellen mit 0,2 M Phosphatpuffer gewaschen, für 10 Minuten in 50% Äthanol, 10 Minuten in 70% Äthanol und abermals 10 Minuten in 70% Äthanol entwässert. In diesem Zustand wurden sie nach Düsseldorf gebracht, wo sie von Herrn Dr.Frenzel elektronenmikroskopisch untersucht wurden. Aliquote der Zellsuspension wurden nach der OsO_4-Behandlung abgezweigt und zur Herstellung lichtmikroskopischer Präparate verwendet.

5.7. Bestimmung der Aktivität von LDH, GOT, GPT, GlDH

Zur Bestimmung der Aktivität der oben genannten Enzyme wurden jeweils 1 ml Zellsuspension nach 30 bzw. 60 Minuten den Inkubationsansätzen entnommen und zentrifugiert (50 g, 2 Minuten). Der Überstand wurde vollständig vom Zellpellet abgetrennt, mit 5 µl Triton X 100 versetzt und bis zur Bestimmung bei 0°C aufbewahrt (Eisbad). Das Zellpellet wurde mit Inkubationspuffer/Triton X 100(0,1%) versetzt und homogenisiert (Potter-Elvehjem). Die Enzymaktivitäten wurden, nach entsprechender Verdünnung der Ansätze, mittels Testkombinationen (Boehringer, Mannheim) bestimmt.

5.8. Messung von ATP, ADP, AMP

Zur Messung von ATP wurde nach 60 Minuten Inkubationszeit 1 ml der Zellsuspension entnommen, mit 1 ml 1N $HClO_4$ versetzt, gevortext und bei Raumtemperatur 10 Minuten stehengelassen. Nach Zentrifugation wurde im Überstand ATP bestimmt.

Zur Bestimmung von ADP/AMP wurde 1 ml Zellsuspension

entnommen und mit 0,6 N $HClO_4$ (4 ml) versetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte gemäß der Anleitung "Test-Combination ADP/AMP" (Boehringer).

5.9. Messung der Gluconeogenese

4-5 ml Zellsuspension (Medium: Hank's-Lösung ohne Glucose, mit Alanin und Lactat, je 10 mmolar) wurden bei 37°C inkubiert. Zum Zeitpunkt t_o und nach 60 Minuten wurden dem Ansatz je 300 µl Zellsuspension entnommen, die mit 150 µl 1N $HClO_4$ versetzt wurden. Nach Zentrifugation wurde im Überstend, gegebenfalls nach entsprechender Verdünnung, die Glucosekonzentration mittels der Testcombination "Glucoquant", Boehringer, bestimmt. Die Syntheserate ergibt sich aus der Differenz der bestimmten Werte nach 0 und 60 Minuten.

5. 10. Messung der Harnstoffsynthese

3-4 ml Zellsuspension in Hank's-Medium wurden 60 Minuten inkubiert. Nach 0 und 60 Minuten wurden je 0,5 ml Zellsuspension entnommen und zentrifugiert. Im Überstand wurde der Harnstoff photometrisch bestimmt (Testcombination, Boehringer).

5.11. Messung der RNA-Synthese

3 ml Zellsuspension (ca 2,5 x 10^6 Zellen/ml) wurden 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden jedem Inkubationszusatz 0,375 µCi ^{14}C-Uridin zugegeben. Nach verschiedenen Zeiten (10-60 Minuten) wurden jeweils 150 µl Probe entnommen und in 5 ml eiskalte 5% TCA injiziert, Die Ansätze wurden ca 30 Minuten auf Eis stehengelassen und anschließend über Milliporefilter (Porengröße: 0,45 µ) abgesaugt, 5x mit 5% TCA gewaschen und bei 40-45°C getrocknet. Die Filter wurden in Toluolscintillator ausgezählt.

5.12. Messung der Proteinsynthese

2-4 ml Zellsuspension (ca 3x10^6 Zellen/ml) wurden mit 0,5 bzw. 1 µCi ^{14}C-Valin bzw. ^{14}C-Proteinhydrolysat

bei 37°C inkubiert. An verschiedenen Zeiten (40-200 Minuten) wurden den Ansätzen je 250 µl Zellsuspension entnommen und zentrifugiert. Vom Überstand wurden 150 µl in 5ml eiskalte 10% TCA pipettiert. Dem Fällungsansatz wurden 200 µl kalte Aminosäurelösung (100-fach, Serva) bzw. 200 µl Valinlösung (18 mg/10 ml Puffer) sowie Rinderserumalbumin (5mg/2ml Puffer) zugegeben, um die Fällung quantitativ zu gestalten. Nach 30 Minuten (Eisbad) wurde abgesaugt (Milliporefilter, Porengröße 0,45 µ) und 5x mit eiskalter 5% TCA nachgewaschen. Die Filter wurden in 10 ml Toluolscintillator ausgezählt.

5.13. Proteinbestimmung

Es wurde die Methode von Lowry (74), modifiziert nach (75) verwendet. Die zu bestimmende Hepatocyten- bzw. Mitochondrienfraktion wurde zuvor 15 Sekunden beschallt, wodurch eine homogene Suspension erhalten wurde, von der Aliquote zur Bestimmung verwendet wurden.

5.14. Isolierung der Mitochondrien (76, 77)

Die Ratte wurde durch Genickschlag getötet, dekapitiert und gut entblutet. Nach Entnahme der Leber wurde sie in eiskaltes Isolationsmedium übergeführt (0,25 M Sucrose/1mM EDTA-Na_2/0,01 M Tris HCl, mit 3N KOH auf pH 7,2 eingestellt). Die Leber wurde im Isolationsmedium fein zerschnitten und 6,4 g in 30 ml Isolationsmedium unter Eiskühlung homogenisiert (Potter mit weitgängigem Teflonpistill, 60 Umdrehungen/Minute, 2 Durchgänge).Das Homogenat wurde durch ein grobmaschiges Nylonnetz gefiltert und dann 10 Minuten bei 1200 rpm bei 0°C-2°C zentrifugiert (Beckman J-6, Ausschwingrotor JS-4.2). Der Überstand wurde in ein vorgekühltes Zentrifugenglas entleert, nachdem vorher die oben schwimmende Fettschicht sehr sorgfältig entfernt wurde. Anschließend wurde 12 Minuten bei ca 4000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das

Mitochondrienpellet noch 3x unter den gleichen Bedingungen mit Isolationsmedium gewaschen. Schließlich wurden die Mitochondrien in ca 1-1,5 ml Isolationsmedium suspendiert und auf Eis gestellt. Zu den Messungen wurden jeweils 50 µl verwendet.

5.15. Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien (78-82)

Die Messung der charakteristischen Atmungsgrößen wurde polarographisch mit Hilfe einer modifizierten Clark-Elektrode durchgeführt (Sauerstoffmessgerät der Firma Bachofer, Reutlingen). Diese Gerät wurde von Delieu und Walker entwickelt und ist in (83) in allen Einzelheiten beschrieben. Die Messungen wurden wie folgt ausgeführt: In das auf 25°C thermostatisierte Reaktionsgefäß wird 1 ml Basismedium gegeben. (0,15 M KCl/6 mM $MgCl_2$/0,01 M Tris-HCl/1,5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2). Das Basismedium wurde mit Sauerstoff gesättigt und enthält dann 258 nMol Sauerstoff/ml bei 25°C. Am Schreiber wird dieser 100%-Bereich und der 0%-Bereich (=sämtlicher Sauerstoff ist im Reaktionsgefäß verbraucht) eingestellt. Der 0%-Bereich wurde durch Zugabe von Natriumthiosulfat zum Reaktionsmedium bestimmt ($Na_2S_2O_4 + O_2 + H_2O$ ----- $NaHSO_4 + NaHSO_3$).
Zu den 1 ml Atmungsmedium wurden jeweils 50 µl Mitochondriensuspension gegeben. Status 4 Atmung wurde durch Zugabe von 10 µl Succinatlösung (200 mM) bzw. 10 µl α-Ketoglutaratlösung (200 mM) erreicht. Durch Zugabe von 5 µl ADP-Na_2 (25 mmolare Lösung) wurde die Atmung in den Status 3 übergeführt.
Die Ermittlung des Atmungskontrollkoeffizienten bzw. des P/O-Quotienten ist aus Abbildung 1 zu entnehmen. Nach jeder Messung wurden Aliquote der Mitochondrienlösung entnommen und deren Proteingehalt bestimmt.

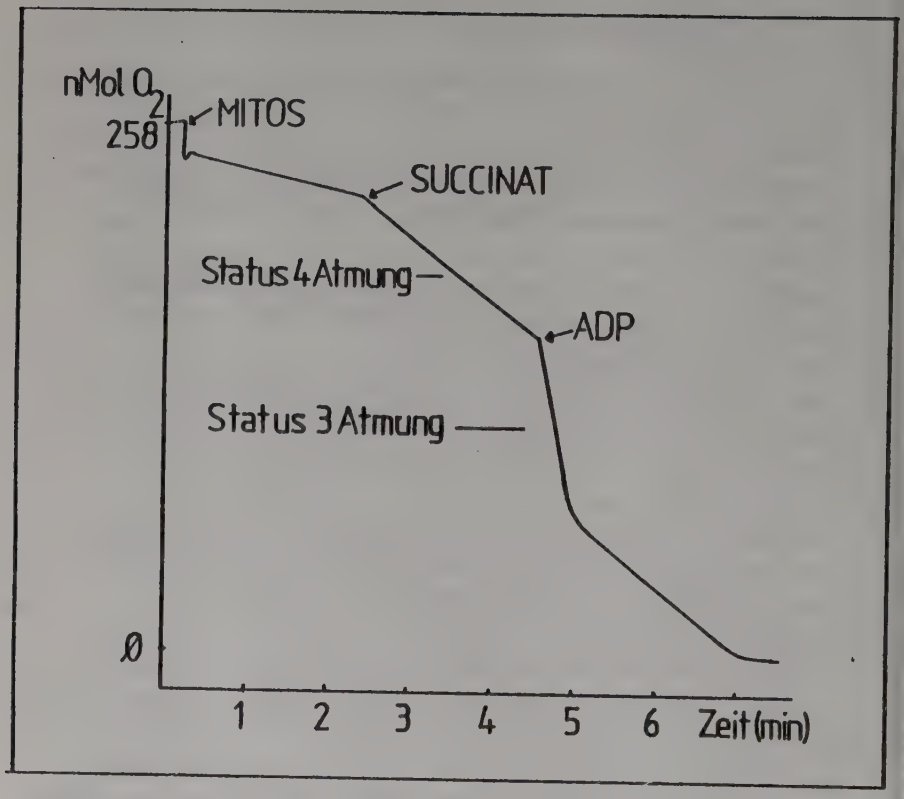


Abb.1: Ermittlung des Atmungskontrollkoeffizienten (ACR) bzw. des P/O-Quotienten

$$\text{ACR} : \frac{\text{Atmungsrate in Status 3}}{\text{Atmungsrate in Status 4}}$$

$$\text{P/O-Quotient:} \quad \frac{\text{zugefügte Menge ADP}}{\text{verbrauchte Menge } O_2 \text{ in Status 3}}$$

3.16. Übersicht der durchgeführten Versuche

Hepatocytenisolierung

Inkubation: 60-180 min bei 37°C unter Carbogenbegasung
Inkubationszusätze: Puffer (neg.Kontrolle)/VT/Nativ/ Dialysat aus verbr.+unverbr.Haut/Phalloidin usw (pos. Kontrolle)

Messung allgemeiner Vitalitäts-kriterien	Messung ATP-abhängiger Reaktion
Licht-und Elektronenmikroskopie	Harnstoffsynthese
Trypanblautest	Gluconeogenese
Enzymaustritt	RNA-Synthese
Succinatstimulierung	Proteinsynthese
Atmungsmessungen	ATP/ADP-Quotient
Hormonsensibilität	

Mitochondrienisolierung

Vorbehandlung bzw. Direktinkubation mit:
VT / Nativ / Endotoxin / Dialysat aus verbr.+unverbr. Haut/trockenes Destillat/Homogenat aus verbr.+unverbr.H

vorbehandelte Tiere	Direktinkubation
endogene Atmung	endogene Atmung
Status 3 Atmung	Status 3 Atmung
Status 4 Atmung	Status 4 Atmung
ACQ	ACQ
P/O-Quotient	

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das bis heute ungelöste Problem der Spätmortalität nach schweren Verbrennungen führte immer wieder zur Annahme, daß eine Intoxikation mit körpereigenen Giften dabei eine entscheidende Rolle spielen könnte. Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen berichten, daß ihnen die Isolierung körpereigener Substanzen mit biologischer Wirkung nach schweren Verbrennungen gelungen sei, rückte in den letzten Jahren zunehmend das von der Basler Gruppe um Allgöwer und Schönenberger isolierte Verbrennungstoxin in den Mittelpunkt des Interesses: Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses Verbrennungstoxin bezüglich seiner biologischen Wirkung auf den Leberstoffwechsel hin zu untersuchen. Zugleich wurden niedermolekulare Extrakte verbrannter und unverbrannter Haut auf ihre mögliche Beeinflussung des Leberstoffwechsels untersucht. Als Testsystem wurden isolierte Hepatocyten bzw. Lebermitochondrien verwendet. Dabei wurden folgende Befunde erhalten:
Das Basler Verbrennungstoxin war bei allen untersuchten Stoffwechselreaktionen wirkungslos. Die grundsätzliche Ansprechbarkeit der verwendeten Testsysteme konnte durch Kontrollversuche sichergestellt werden. Möglicherweise ist das gewählte in vitro System (isolierte Hepatocyten bzw. Mitochondrien) als Verbrennungstoxin-Testsystem ungeeignet. Eher wahrscheinlich ist aber, daß das als Verbrennungstoxin angebotene Substrat biologisch inaktiv ist; dafür sprechen neben den negativen Resultaten der Stoffwechseluntersuchungen einige Befunde: Es gelang nie, das Verbrennungstoxin in der Form zu isolieren und zu reinigen, wie es in der Literatur beschrieben ist, obwohl der Aufarbeitungsgang technisch anspruchslos ist. Des weiteren konnte der Letalitätstest auch nicht annähernd in der beschriebenen eindeutigen Form nachvollzogen werden. Schließlich fällt bei genauerer Durchsicht der Literatur auf, daß einige der erhobenen Befunde wider-

sprüchlich sind und daß die gezogenen Schlußfolgerungen manchmal einen recht spekulativen Charakter haben. Es besteht der Verdacht, daß manche der von anderen Arbeitsgruppen erhaltenen Resultate aufgrund von Endotoxinkontaminationen des Verbrennungstoxins zustande kamen.

Im Gegensatz zum Verbrennungstoxin waren niedermolekulare Extrakte verbrannter und unverbrannter Haut aktiv; Zwei Effekte wurden gefunden:

Dialysate sowohl von verbrannter als auch von unverbrannter Haut hatten einen stark hemmenden Einfluß auf die RNA-Synthese isolierter Hepatocyten. Dabei handelt es sich offensichtlich um eine oder um mehrere Substanzen, die bei der Verbrennung freigesetzt werden. Sie verlieren ihre RNA-Synthese hemmende Aktivität durch Erhitzen auf ca. 200°C.

Zum anderen wurde das trockene Destillat (bei Temperaturen bis 270°C) von Mäusehäuten als biologisch aktiv gefunden. Es war über die Beeinflussung der Mitochondrienatmung wirksam und zeigte stark entkoppelnde Effekte.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. L.Koslowski, Langenbecks Arch.Chir.304,672 (1963)
2. F.E.Müller, Unfallheilkunde 87,121 (1965)
3. G.Lemperle, Research in Burns,edited by P.Matter, T.L.Barclay, Z.Konickova, Hans Huber Publishers Bern, Stuttgart, Vienna (1971)
4. B.A.Pruitt, J.A.Moncrief, J.Surg.Res.7,332 (1967)
5. K.Schmidt, Habilitationsschrift, Tübingen (1977)
6. K.Schmidt, in Burn Injuries,Symposium Tübingen, S 65ff, Editors:L.Koslowski, K.Schmidt, R.Hettich, F.K.Schattauer Verlag,Stuttgart-New York (1979)
7. A.Simonart, Bull.Acad.Soc.Roy.Med.Belg.12,116 (1957)
8. P.van Canghem,Arch.int.Pharmacodyn.Ther.87,99 (1951)
9. S.R.Rosenthal, K.C.Thadhani, G.Crouse, W.A.Spurrier, N.Y.Acyd.Sci.150,792 (1968)
10. S.R.Rosenthal, K.C.Thadhani, W.A.Spurrier, J.Exp. Med.Surg.26,124 (1968)
11. A.A.Hakim, P.L.Hawley, S.R.Rosenthal, Fed.Proc.28, 712 (1969)
12. P.L.Hawley, A.A.Hakim, S.R.Rosenthal,Physiologist 12,250 (1969)
13. S.R.Rosenthal, Ann.Surg.106,257 (1937)
14. C.R.Baxter, W.A.Cook, G.T.Shires, Surg.Forum 17,1 (1966)
15. N.A.Fedorov, Vopr.Med.Khim.20371 (1974)
16. B.E.Mowschew, Patol.Fiziol.eksp.ter.15,37 (1971)
17. K.Staedtler, M.Allgöwer, L.B.Cueni, G.A.Schönenberger, Res.Exp.Med.158,23 (1972)
18. K.Staedtler, M.Allgöwer, Eur.Surg.Res.4,198 (1972)
19. G.A.Schönenberger, L.Cueni, U.Bauer, U.Eppenberger, Biochem.Biophys.Acta 263,149 (1972)
20. G.A.Schönenberger, M.Allgöwer, B.Kremer, K.Städtler, Chirurg 47,582 (1976)
21. M.Allgöwer, B.Cueni, K.Städtler, G.A.Schönenberger, J.Trauma 13,95 (1973)
22. K.Städtler, M.Allgöwer, L.B.Cueni, G.A.Schönenberger, Res.Exp.Med.158,34 (1972)

23. L.B.Cueni, M.Allgöwer, G.A.Schönenberger, Res.Exp. Med.156,110 (1971)
24. L.B.Cueni, G.A.Schönenberger, M.Allgöwer, Experientia (Basel) 26,685 (1970)
25. G.A.Schönenberger, Monogr.Allergy 9,72 (1975)
26. L.B.Cueni, M.Allgöwer, U.Eppenberger, K.Städtler, G.A.Schönenberger, inResearch in burns,S471 ff, Hans Huber Publishers Bern Stuttgart Vienna (1971)
27. G.A.Schönenberger,in:Burn Injuries,Symposium Tübingen 1977, S101ff,F.K.Schattauer Verlag,Stuttgart-New York (1979)
28. G.A.Schönenberger, M.Allgöwer, F.Burkhart, W.Müller, K.Städtler, P.Zellner,Zentralbl.Chir.99,1089 (1974)
29. G.A.Schönenberger, U.Bauer, L.B.Cueni, U.Eppenberger, K.Städtler, M.Allgöwer,Biochem.Biophys.Acta 263,164 (1972)
30. G.A.Schönenberger, M.Allgöwer, L.B.Cueni, U.Eppenberger, K.Städtler, Eur.J.Clin.Invest.2,154 (1972)
31. B.Kremer, I.E.Richter, H.Frenzel, U.Schäfer, K.Städtler, G.A.Schönenberger, Microscopia Acta 77,420 (1976)
32. M.Allgöwer,C.Burri,L.Cueni,F.Engley,H.Fleisch,U.F.Gruber,F.Harder,R.G.G.Russell,N.Y.Acad.Sci,150,807 (1968)
33. L.B.Cueni, M.Allgöwer, G.A.Schönenberger,Z.ges.exp.Med. 156,110 (1971)
34. G.A.Schönenberger, P.Matter, M.Allgöwer,Excerpta med (Amsterdam) Int.Congr.Serol.190,1 (1969)
35. J.Schölmerich, B.Kremer, I.E.Richter, K.Schmidt, H. Setyadharma, G.A.Schönenberger,Scand.J.Plast.Reconstr. Surg.13,223 (1979)
36. B.Kremer, H.Frenzel, M.Allgöwer, K.Städtler, G.A.Schönenberger,Verh.Dtsch.Ges.Pathol.59,581 (1976)
37. B.Kremer,H.Frenzel,J.Schölmerich,M.Allgöwer,A.Schweitzer,G.A.Schönenberger,Chir.Forum Exp.Klin.Forsch.145 (1979)
38. B.Kremer,J.Schölmerich,M.Allgöwer,K.Schmidt,A.Schweitzer,G.A.Schönenberger,Helv.Chir.Acta 45,147 (1978)
39. J.Schölmerich,K.Schmidt,B.Kremer,V.Hagmeier,H.Mastari, S.Hermawan,Chir.Forum Exp.Klin.Forsch.140-4 (1979)

40. J.Schölmerich,B.Kremer,K.Schmidt,G.A.Schönenberger, S.Hermawan,Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med.83,519 (1978)
41. B.Wüst,M.Allgöwer,B.Kremer,A.M.Scheidegger,J.Schölmerich,A.Schweitzer,G.A.Schönenberger,in:5th International Congress on Burn Injuries,Abstract book,59 Stockholm (1978)
42. H.Hönig, Bild Wiss.1,54 (1974)
43. Proceedings of a Discussion Meeting Toxic Factors in Burns,European Research Office/Chelsea College University of London,London (1974)
44. U.Klein, Dissertation Tübingen (1977)
45. K.Schmidt,in:Burn Injuries,Symposium Tübingen 1977 S65 ff,F.K.Schattauer Verlag,Stuttgart-NewYork (1979)
46. L.Koslowski,B.Domres,W.Heller,K.Schmidt,in:Proceedings of a Discussion Meeting Toxic Factors in Burns (siehe 43)
47. K.Schmidt,in:Proceedings of a Discussion Meeting Toxic Factors in Burns,S146 ff (siehe 43)
48. J.Folch,M.Less,S.H.Sloan-Stanley,J.Biol.Chem.226, 497 (1957)
49. B.A.Pruitt,J.A.Moncrief,J.Surg.Res.7,332 (1967)
50. R.B.Howard,A.K.Christensen,F.A.Gibbs,L.A.Pesch,J.Cell. Biol.35,675 (1967)
51. M.N.Berry,D.S.Friend,J.Cell.Biol.43,506 (1969)
52. M.N.Berry,Methods Enzymol.Vol.32,625 (1974)
53. H.Baur,S.Kasperek,E.Pfaff,Physiol.Chem.356,827 (1975)
54. L.J.Crane,D.L.Miller,J.Cell.Biol.72,11 (1977)
55. E.A.Modjanova,A.G.Malenkov,Exp.Cell.Res.76,305 (1973)
56. P.O.Seglen,Exp.Cell.Res.76,25 (1973)
57. S.T.Jacob,P.M.Bhargava,Exp.Cell.Res.27,453 (1962)
58. D.R.Coman,Cancer Res.14,519 (1954)
59. T.S.Leeson,H.Kalant,J.Biophys.Biochem.Cytol.10,95 (1961)
60. G.Schreiber,M.Schreiber,Sub.Cell.Biochem.2,321 (1973)
61. J.Pisano,J.P.Filkins,N.R.Di Luzio,Proc.Soc.Exp.Biol. Med.128,917 (1968)
62. J.O.Laws,L.H.Stickland,Exp.Cell.Res.24,240 (1961)
63. P.O.Seglen,Exp.Cell.Res.82,391 (1973)
64. D.M.Mills,D.Zucker-Franklin,Am.J.Pathol.54,147 (1969)

65. B.Roser,J.Reticuloendothel.Soc.5,455 (1968)
66. B.Howard,L.A.Pesch,J.Biol.Chem.243,3105 (1968)
67. S.R.Wagle,W.R.Ingebretsen,Methods Enzymol 35,Part B, 579 (1975)
68. S.R.Hilfer,J.M.Brown,Exp.Cell.Res.65,246 (1971)
69. H.Baur,Dissertation Tübingen (1975)
70. H.Baur,Diplomarbeit Tübingen (1972)
71. S.Briggs,R.A.Freedland,Biochem.J.160,205 (1976)
72. O.Barnabei,G.Leghissa,V.Tomasi,Biochem.Biophys. Acta 362,316 (1974)
73. P.M.Gallop,S.Seifter,E.Meilman,J.Biol.Chem.234, 285 (1959)
74. O.H.Lowry,J.Biol.Chem.193,265 (1951)
75. G.Drews,Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler,S110,Springer-Verlag,Berlin-Heidelberg-New York (1968)
76. M.Klingenberg,L.Szarkowska,Biochem.Z.338,674 (1963)
77. J.Haselbach,Diplomarbeit Tübingen (1977)
78. E.Bustamente,J.W.Soper,P.L.Pedersen,Anal.Biochem.80, 401 (1977)
79. K.Minnaert,Biochem.Biophys.Acta 44,595 (1960)
80. E.Weinbach,J.Biol.Chem.236,1526 (1960)
81. B.Hagihara,Biochem.Biophys.Acta 46,134 (1961)
82. W.Chance,G.R.Williams,Nature 175,1120 (1955)
83. T.Delieu,D.A.Walker,New.Phytol.71,201 (1972)
84. L.Z.Bito,Science 196,83 (1977)
85. J.Schölmerich,E.Richter,H.Setyadharma,B.Kremer,K. Schmidt,G.A.Schönenberger,Wehrmed.Monatsschr.5,138 (1979)
86. M.Frimmer,Biol.Unserer Zeit 5,147 (1979)
87. F.Kissmeyer-Nielsen,K.E.Kjerbye,Histocompatibility testing,S381,Copenhagen:Munskgaard (1967)
88. F.W.Schmidt,Med.Unserer Zeit 5,150 (1977)
89. R.B.Howard,J.C.Lee,L.A.Pesch,J.Cell.Biol.57,642 (1973)
90. D.R.La Brecque,R.B.Howard,Methods Cell.Biol.Vol XIV, 327 (1976)
91. D.Mayer,M.Stöhr,L.Lange,Eur.J.Cell.Biol.15,321 (1977)

92. M.Suzanger,J.A.Dickson,Exp.Cell.Res.63,353 (1970)
93. B.Quistorff,S.Bondesen,N.Grunnet,Biochem.Biophys. Acta 320,503 (1973)
94. D.M.Crisp,C.I.Pogson,Biochem.J.126,1009 (1972)
95. M.Frimmer,R.Kroker,Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmakol.279,99 (1973)
96. F.Hofman,J.Wilkening,J.Nowack,K.Decker,Physiol.Chem. 357,427 (1976)
97. O.Seglen,Biochem.Biophys.Acta 442,391 (1976)
98. L.J.Crane,D.L.Miller,Biochem.Biophys.Res.Commun.60, 1269 (1974)
99. A.G.East,L.N.Louis,R.Hoffenberg,Exp.Cell.Res.76,41 (1973)
100. C.F.A.van Bezooijen,T.Grell,D.L.Knook,Biochem.Biophys.Res.Commun.2,513 (1976)
101. K.N.Jeejeebhoy,J.Ho,G.R.Greenberg,M.J.Phillips,A. Bruce-Robertson,U.Sodtke,Biochem.J.146,141 (1975)
102. H.Bojar,K.Balzer,K.Reiners,M.Basler,W.Reipen,W.Staib, Klin.Chem.Klin.Biochem.13,25 (1975)
103. D.Keppler,J.Pausch,K.Decker,J.Biol.Chem.249,211 (1974)
104. M.Castanga,Chauveau,J.Exp.Cell.Res.57,211 (1969)
105. P.F.Jezyk,J.P.Liberti,Arch.Biochem.Biophys.134,442 (1969)
106. E.A.Siess,O.H.Wieland,Biochem.Biophys.Res.Commun.64, 323 (1975)
107. S.R.Wagle,F.Hofmann,K.Decker,Biochem.Biophys.Res. Commun.72,448 (1976)
108. S.Briggs,R.A.Freedland,Biochem.J.160,205 (1976)
109. O.Seglen,Biochem.Biophys.Acta 338,317 (1974)
110. J.C.Garrison,R.C.Hayes,J.Biol.Chem.165,5333 (1973)
111. W.R.Ingebretsen,S.R.Wagle,Biochem.Biophys.Res. Commun.47,403 (1972)
112. M.E.M.Tolbert,J.N.Fain,J.Biol.Chem.249,1162 (1974)
113. M.E.M.Johson,M.Das,F.R.Butcher,J.N.Fai,J.Biol.Chem. 247,3229 (1972)
114. R.N.Zahlten,F.W.Stratman,Arch.Biochem.Biophys.163, 600
115. D.F.Wilson,M.Stubbs,R.L.Veech,M.Erecinska,H.A.Krebs, Biochem.J.140,57 (1974)

116. G.R.N.Jones,R.Kramer,Biochem.Pharmacol.27,2931 (1978)
117. J.R.Aprille,J.A.hom,J.Rulfs,J.Trauma 17,279 (1977)
118. J.Schröder,Biol.Unserer Zeit 1,11 (1980)
119. O.R.Pavlovskis,M.Pollack,L.T.Callahan,B.H.Iglewski, Infect.Immun.18,596 (1978)
120. Microbial Toxins,edites by K.Solomon,G.Weinbaum, J.A.Samuel,Academic Press.NewYork and London (1971)
121. L.J.Berry,Metabolic Ellects of Bacterial Endotoxins in:Microbial toxins, S165 (siehe 120)
122. S.Kato,T.Kurato,M.Fujimaki,Agr.Biol.Chem.35,2106 (1971)
123. P.G.Simmonds,E.E.Medley,M.A.Ratcliff,G.P.Shulman, Anal.Chem.44,2060 (1972)
124. Y.C.Lien,W.W.Nawar,J.Food Science 39,911 (1974)
125. Y.C.Lien,W.W.Nawar,J.Food Science 39,914 (1974)
126. E.B.Higman,I.Schmeltz,W.S.Schlotzhauser,J.Agri. Food Chem.4,636 (1970)
127. A.Crossley,T.D.Heyes,B.J.F.Hudson,J.Am.Oil Chem. Soc.39,9 (1962)
128. E.Pfaff,Dissertation Marburg (1965)
129. M.Klingenberg,E.Pfaff,in:Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria(Ed.:J.M.Trager,S.Papa, E.Quagliariello,E.C.Slater,S180,Elsevier,Amsterdam (1966)
130. G.R.N.Jones,Med.Hypoth.1,118 (1975)
131. G.R.N.Jones,R.Kramer,Biochem.Pharmacol.27,2931 (1978)
132. G.Arturson,in:Burn Injuries,Ed.:L.Koslowski,K.Schmidt, R.Hettich,F.K.Schattauer-Stuttgart-NewYork,S115 (1979)
133. H.Nordström,S.Lennquist,B.Lindell,H.E.Sjöberg,S.O. Liljedahl,B.Nylen,in:5th International Congress on Burn Injuries Stockholm,1978,Abstract book,S23
134. M.S.Zaki,J.F.Burke,R.L.Trelstad,Arch.Surg.113,605 (1978)
135. W.Schumer,J.C.Kukral,Surgery 63,630 (1968)
136. J.R.Brobeck,J.F.in Fulton,:A textbook of physiology,ed.17 Philadelphia:Saunders 1955

137. M.Kleiber,The fire of life,New York,Wiley (1961)
138. A.D.Keller,in:The physiology of induced hypothermia, National Research Council Publication (1956)
139. J.Himms-Hagen,Lipids 7,310 (1972)
140. D.G.Nicholls,FEBS Letters 61,103
141. B.E.Zawacki,W.Spitzer,A.D.Mason,L.A.Johns,Ann.Surg. 171,236 (1970)
142. R.Dolecek,D.Buryskova,M.Buse,Z.Konickova,D.Kupermine, W.Mahaffey,M.Zavada,in:P.Matter,T.L.Barclay,Z.Konickova,(Ed.)Research in burns,Bern,Stuttgart,Vienne:Huber (1971)
143. P.Hinton,Postgrad.Med.J.48,144 (1972)
144. M.Miskulin,F.Moatti,A.M.Robert,R.Monteil,G.Guilband, J.Med.9,405 (1979)
145. T.G.Obrig,W.J.Culp,W.L.Mc Keehan,B.Hardesta,J.Biol. Chem.246,174 (1971)
146. L.Träger,Einführung in die Molekularbiologie S263, G.Fischer,Stuttgart
147. P.Laggner,in:Toxic factors in burns,European Research Office,Chelsea College Universita of London S231, London 1974
148. J.Schölmerich,in:Burn injuries,Symposium Tübingen 1977 S85,F.K.Schattauer Verlag,Stuttgart-New York (1979)
149. J.Levin,T.E.Poore,B.A.Neil,P.Zauber,R.S.Oser,N.Engl. J.Med.283,1313-1316 (1970)

LEBENSLAUF

1949	Am 6.Februar wurde ich als Sohn des Dr.Armin Bruchelt und seiner Frau Erna,geb.Menzel,in Deutschlandsberg/Österreich geboren.
1955–1959	Besuch der Volksschule in Graz.
1959–1967	Besuch des II.Bundesrealgymnasiums in Graz
1967–1972	Chemiestudium an der Karl-Franzens-Universität in Graz,welches ich mit der Ablegung der vier Doktorandenprüfungen abschloß.
1972–1977	Beginn des Biochemiestudiums an der Universität Tübingen,welches ich im August 1977 mit dem Diplom(Biochemie) abschloß.
1978	Beginn der Diplomarbeit in Chemie,die als Abschluß meines Grazer Chemiestudiums im Juni 1979 mit dem Diplom (Chemie) beendet wurde.
1977–1980	Von März 1977 an arbeitete ich unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr.W.Voelter bis Februar 1980 an der vorliegenden Dissertation,die im Labor der Chirurgischen Klinik Tübingen und am Institut für organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt wurde.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herrn Professoren und Dozenten:

Anorganische Chemie:	E.Gagliardi
Organische Chemie :	E.Ziegler,T.Kappe,H.Junek
Physikalische Chemie:	O.Kratky, L.Kahovec
Biochemie:	E.Schauenstein, H.Esterbauer
Physik:	J.Wagner, G.Porod
Zoologie:	N.Schuster
Mathematik:	I.Pilz
Physiologische Chemie:	G.Weitzel, J.Guglielmi, H.Probst,D.Mecke
Physikalische Biochemie:	W.Voelter
Physiologie:	F.Möhres, G.Kissling
Pharmakologie:	H.Remmer, E.Pfaff, K.F.Sewing
Anatomie:	K.Mörike
Genetik:	W.Seyffert
Mikrobiologie:	H.Zähner, V.Braun
Immunologie:	W.Bessler